

iRGD-vermittelte Effizienzsteigerung des  
therapeutischen Einsatzes von [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid bei  
somatostatinrezeptorpositivem, malignem Gewebe  
mit neuroendokrinen Eigenschaften  
unter besonderer Betrachtung der Nierenfunktion  
in einem Mausmodell

von Veronika Juliane Heigl

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

iRGD-vermittelte Effizienzsteigerung des  
therapeutischen Einsatzes von [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid bei  
somatostatinrezeptorpositivem, malignem Gewebe  
mit neuroendokrinen Eigenschaften  
unter besonderer Betrachtung der Nierenfunktion  
in einem Mausmodell

von Veronika Juliane Heigl  
aus Rosenheim

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Angefertigt in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Klinikum Großhadern

Mentorin: Dr. med. vet. Janette M. Carlsen

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**Korreferent/en:** Priv.-Doz. Dr. Andreas Parzefall

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Neuroendokrine Neoplasien .....</b>	<b>3</b>
1.1	Gemeinsamkeiten neuroendokriner Neoplasien.....	3
1.2	Einteilung neuroendokriner Neoplasien.....	5
1.3	Neuroendokrine Neoplasien des gastrointestinalen Systems .....	8
1.4	Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas .....	9
1.4.1	Anatomie und Funktion des Pankreas bei Mensch und Tier.....	9
1.4.2	Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas beim Menschen.....	10
1.4.3	Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas bei Tieren.....	12
1.5	Neuroendokrine Neoplasien des bronchopulmonalen Systems .....	14
1.6	Diagnostik und Therapie .....	15
1.7	Tumormodelle mit neuroendokrinen Eigenschaften .....	16
<b>2.</b>	<b>Diagnostik und Therapie in der Nuklearmedizin .....</b>	<b>17</b>
2.1	Strahlungsarten und Wirkung auf Materie .....	17
2.1.1	Grundlagen und Zerfallsarten.....	17
2.1.2	Wechselwirkung mit Materie und biologische Strahlenwirkung.....	18
2.2	Somatostatin und dessen Analoga.....	19
2.3	Messverfahren der Nuklearmedizin .....	22
2.3.1	Detektion und Weiterverarbeitung von $\gamma$ -Strahlen.....	22
2.3.2	$^{99m}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	23
2.3.2.1	Funktionelle Einheiten der Niere .....	23
2.3.2.2	Prinzip der $^{99m}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	23
2.3.3	PET-Messung mit rezeptorspezifischen $^{68}\text{Ga}$ -Tracern.....	25
2.4	Endoradiotherapie neuroendokriner Neoplasien .....	26
2.4.1	Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie .....	26
2.4.2	Toxizität und limitierende Faktoren .....	28
<b>3.</b>	<b>Tumorbiologie und der Einsatz von iRGD.....</b>	<b>30</b>
3.1	Tumorentstehung und Tumorwachstum .....	30
3.2	Tumorstroma, Angiogenese und Metastasierung.....	31
3.3	Integrine, Neuropillin-1 und iRGD.....	33

<b>4.</b>	<b>Arbeitshypothese .....</b>	<b>37</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Chemikalien und Medikamente .....</b>	<b>39</b>
<b>2.</b>	<b>Lösungen .....</b>	<b>40</b>
2.1	Injektionslösungen .....	40
2.2	Zellkulturmedien .....	40
<b>3.</b>	<b>Geräte und Materialien .....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>Programme .....</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>iRGD .....</b>	<b>43</b>
5.1	iRGD zur Koinjektion .....	43
5.2	iRGD zur Kopplung mit $^{68}\text{Ga}$ .....	43
<b>6.</b>	<b>Radionuklide und Herstellung der Radiopharmaka .....</b>	<b>44</b>
6.1	$[\text{}^{177}\text{Lu-DOTA}^0, \text{Tyr}^3]\text{Octreotid}$ .....	44
6.2	$^{68}\text{Ga-DOTA-iRGD}$ .....	44
6.3	$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ .....	45
<b>7.</b>	<b>Zelllinien und Zellkultur .....</b>	<b>45</b>
7.1	AR42J: Azaserin-induziertes Pankreasadenokarzinom der Ratte .....	45
7.2	NCI-H69: humanes kleinzelliges Lungenkarzinom .....	45
7.3	Kultivierung der Zellen .....	45
7.3.1	AR42J .....	45
7.3.2	NCI-H69 .....	47
7.4	Vorbereitung der Zellen für die subkutane Inokulation .....	48
<b>8.</b>	<b>Tiermodell .....</b>	<b>49</b>
8.1	Versuchstiere und Haltung .....	49
8.2	Anästhesie und Euthanasie.....	50
8.3	Anlegen eines Katheters zur intravenösen Applikation .....	51
<b>9.</b>	<b>Tierexperimente .....</b>	<b>52</b>
9.1	Erzeugung solider, subkutaner Tumoren .....	52
9.2	$\mu\text{PET}$ -Messungen mit $^{68}\text{Ga-DOTA-iRGD}$ zur Darstellung der $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine .....	52
9.3	Aktivitätsanreicherung in Nieren und Tumoren.....	53
9.3.1	Biodistribution und Dosimetrie an NCI-H69-tumortragenden Mäuse.....	53

9.3.2	Biodistribution und Dosimetrie an AR42J-tumortragenden Mäusen.....	55
9.3.3	Statistische Bewertung .....	55
<b>9.4</b>	<b>Therapieversuche mit <math>^{177}\text{Lu}</math>-DOTATOC an AR42J-tumortragenden Mäusen - allgemeines Vorgehen.....</b>	<b>56</b>
9.4.1	Überwachung des Tumolvolumens.....	57
9.4.2	Überwachung des Körpergewichtes.....	58
9.4.3	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	58
9.4.3.1	Berechnung und Beurteilung der korrigierten Aufnahme- und der tubulären Exkretionsrate .....	61
9.4.3.2	Erstellung und Beurteilung der Renogramm-Kurven .....	64
9.4.4	Finale Blutentnahme .....	65
9.4.5	Abbruchkriterien .....	65
9.4.6	Statistische Auswertung hinsichtlich des Überlebens .....	66
<b>9.5</b>	<b>Therapieversuche mit <math>^{177}\text{Lu}</math>-DOTATOC an AR42J-tumortragenden Mäusen - Therapieversuche im Einzelnen.....</b>	<b>67</b>
9.5.1	Therapieversuch I mit einem Therapiezyklus .....	67
9.5.1.1	$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und iRGD-Regime.....	67
9.5.1.2	Überwachung des Tumolvolumens.....	67
9.5.1.3	Überwachung des Körpergewichtes.....	67
9.5.1.4	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	67
9.5.1.5	Finale Blutentnahme .....	67
9.5.1.6	Überleben .....	67
9.5.2	Therapieversuch II mit zwei Therapiezyklen.....	68
9.5.2.1	$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und iRGD-Regime.....	68
9.5.2.2	Überwachung des Tumolvolumens.....	68
9.5.2.3	Überwachung des Körpergewichtes.....	68
9.5.2.4	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	68
9.5.2.5	Finale Blutentnahme .....	68
9.5.2.6	Überleben .....	68
9.5.3	Therapieversuch III mit zwei Therapiezyklen und modifiziertem iRGD-Regime.....	69
9.5.3.1	$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und iRGD-Regime.....	69
9.5.3.2	Überwachung des Tumolvolumens.....	70
9.5.3.3	Überwachung des Körpergewichtes.....	70



9.5.3.4	$^{99m}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	70
9.5.3.5	Finale Blutentnahme .....	70
9.5.3.6	Anfertigen von Blutaussstrichen.....	71
9.5.3.7	Überleben .....	71
9.5.3.8	Präparation der Nieren für die histologische Untersuchung .....	71
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>Manifestation und Erscheinungsbild der subkutanen Tumoren.....</b>	<b>73</b>
1.1	Zelllinie AR42J .....	73
1.2	Zelllinie NCI-H69 .....	74
<b>2.</b>	<b><math>\mu\text{PET}</math>-Messungen mit <math>^{68}\text{Ga}</math>-DOTA-iRGD zur Darstellung der <math>\alpha\text{v}\beta 3</math>-Integrine .....</b>	<b>75</b>
<b>3.</b>	<b>Aktivitätsanreicherung in Nieren und Tumoren.....</b>	<b>76</b>
3.1	Biodistribution und Dosimetrie an NCI-H69-tumortragenden Mäusen.....	76
3.1.1	Biodistribution.....	76
3.1.2	Dosimetrie .....	79
3.2	Biodistribution und Dosimetrie an AR42J-tumortragenden Mäusen.....	80
3.2.1	Biodistribution.....	80
3.2.2	Dosimetrie .....	82
<b>4.</b>	<b>Therapieversuche mit <math>^{177}\text{Lu}</math>-DOTATOC an Mäusen mit AR42J-Flankentumoren .....</b>	<b>83</b>
4.1	Therapieversuch I mit einem Therapiezyklus .....	83
4.1.1	Effektiv erhaltenes $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.....	83
4.1.2	Tumorzvolumen und absolute Volumenänderung.....	83
4.1.3	Körpergewicht .....	85
4.1.4	$^{99m}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	86
4.1.4.1	Korrelation der FUR, FUR <sub>kor</sub> und k <sub>Ex</sub> mit der verabreichten Aktivität .....	86
4.1.4.2	Korrigierte Aufnahmezeit und tubuläre Exkretionsrate.....	86
4.1.4.3	Renogramm-Kurven.....	88
4.1.5	Blutparameter .....	90
4.1.6	Auswertung der Überlebensdaten .....	91
4.2	Therapieversuch II mit zwei Therapiezyklen.....	93
4.2.1	Effektiv erhaltenes $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.....	93
4.2.2	Tumorzvolumen und absolute Volumenänderung.....	93

4.2.3	Körpergewicht .....	95
4.2.4	<sup>99m</sup> Tc-MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	96
4.2.4.1	Korrigierte Aufnahme rate und tubuläre Exkretionsrate .....	96
4.2.4.2	Renogramm-Kurven .....	97
4.2.5	Blutparameter .....	99
4.2.6	Auswertung der Überlebensdaten .....	100
4.3	Therapieversuch III mit zwei Therapiezyklen und modifiziertem iRGD-Regime .....	102
4.3.1	Effektiv erhaltenes <sup>177</sup> Lu-DOTATOC .....	102
4.3.2	Tumervolumen und absolute Volumenänderung .....	102
4.3.3	Körpergewicht .....	104
4.3.4	<sup>99m</sup> Tc-MAG <sub>3</sub> -Nierenfunktionsszintigraphie .....	105
4.3.4.1	Korrigierte Aufnahme rate und tubuläre Exkretionsrate .....	105
4.3.4.2	Renogramm-Kurven .....	106
4.3.5	Blutparameter .....	108
4.3.6	Blutausstriche .....	109
4.3.7	Auswertung der Überlebensdaten .....	110
4.3.8	Histologische Beurteilung der Nieren .....	111
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>115</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>150</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>153</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>156</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>178</b>
<b>XI.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>181</b>
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>185</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<sup>18</sup> F	<sup>18</sup> Flour
<sup>68</sup> Ga	<sup>68</sup> Gallium
<sup>111</sup> In	<sup>111</sup> Indium
<sup>177</sup> Lu	<sup>177</sup> Lutetium
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC	[ <sup>177</sup> Lu-DOTA <sup>0</sup> ,Tyr <sup>3</sup> ]Octreotid
<sup>177</sup> Lu-DOTATATE	[ <sup>177</sup> Lu-DOTA <sup>0</sup> ,Tyr <sup>3</sup> ]Octreotat
<sup>99m</sup> Tc	<sup>99</sup> Technetium (metastabil)
<sup>99</sup> Mo	<sup>99</sup> Molybdän
<sup>176</sup> Yb	<sup>176</sup> Ytterbium
<sup>90</sup> Y	<sup>90</sup> Yttrium
°C	Grad Celsius
%ID	Prozent der injizierten Aktivität
%ID/g	Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
AC	atypisches Karzinoid
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Ala	Alanin
AR42J	Zelllinie des Azaserin-induzierten Pankreasadenokarzinom der Ratten
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATCC	American Type Culture Collection
BED	biologisch effektiven Dosis

---

Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CendR	C-end rule
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
cps	counts per second
CT	Computertomographie
Cys	Cystein
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure (Chelator)
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECL	enterochromaffin-like
ED	extended disease
EDTA	Ethylendiamintetreessigsäure
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
EPR-Effekt	enhanced permeability and retention effect
FACS	fluorescens-activated cell sorting
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
FKS	fetales Kälberserum
FUR	fractional uptake rate (Aufnahmerate)
FUR <sub>kor</sub>	korrigierte fractional uptake rate (korrigierte Aufnahmerate)
G	Gauge bei Kanülengröße
G	Giga bei Blutwerten
GEP	gastroenteropankreatisch
Gly	Glycin

---

GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
Gy	Gray (Energiedosis; pro Masse absorbierte Energie)
h	Stunde
HEPA	high efficiency particulate air
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible transcription factor 1
HPF	high power fields
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
inkl.	inklusive
i. p.	intraperitoneal
iRGD	iRGD-Peptid cyclo(CRGDKPDC)-CONH <sub>2</sub>
i. v.	intravenös
IVC	Individually Ventilated Cages
keV	Kilo-Elektronenvolt
k <sub>Ex</sub>	tubuläre Exkretionsrate
kg	Kilogramm
Ki-67-Index	Proliferationsindex
l	Liter
LCNEC	large-cell neuroendocrine carcinoma (großzelliges neuroendokrines Lungenkarzinom)
LD	limited disease
LET	linearer Energietransfer
Lys	Lysin
MAG <sub>3</sub>	Mercaptoacetyltriglycin
MANEC	mixed adenoneuroendocrine carcinoma (gemischtes adenoneuroendokrines Karzinom)
MBq	Megabecquerel

---

MeV	Mega-Elektronenvolt
MIA PaCa-2	Zelllinie des humanen Pankreasadenokarzinoms
min	Minute
MINTT	minimum transit time
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MRI	magnetic resonance imaging
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Tiere
NaI	Natriumiodid
NaCl	Natriumchlorid
NCI-H69	Zelllinie eines humanen kleinzelligen neuroendokrinen Lungenkarzinoms
NEC	neuroendokrines Karzinom
NEN	neuroendokrine Neoplasie
NET	neuroendokriner Tumor
nm	Nanometer
NOC	[1Na <sup>3</sup> ]Octreotid
NRP	Neuropilin
NRP-1	Neuropilin-1
NRP-2	Neuropilin-2
n. s.	nicht signifikant
NSE	neuronenspezifische Enolase
panNEC	pankreatisches neuroendokrines Karzinom

---

panNET	pankreatischer neuroendokriner Tumor
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDGF	platelet-derived growth factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Phe	Phenylalanin
p. i.	post injectionem
Pro	Prolin
PRRT	Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie
p-Wert	probability-value (Signifikanzwert)
RGD	Arginin-Glycin-Asparagin
ROI	region of interest
rpm	revolutions per minute
RPMI-Medium	Roswell-Park-Memorial-Institut-Zellkulturmedium
S	Schwefel
s. c.	subkutan
SCID	severe combined immunodeficiency (schwerer kombinierter Immundefekt)
SCLC	small cell lung cancer (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
s	Sekunde
SEER Program	“Surveillance, Epidemiology, and End Results“-Programm
S.E.M.	standard error of mean (Standardfehler)
Ser	Serin
sog.	sogenannt
SPARC	secreted protein, acid and rich in cysteine
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie
sstr	Somatostatinrezeptor

---

TATE	[Tyr <sup>3</sup> ]Octreotat
TC	typisches Karzinoid
TGF- $\alpha$	transforming growth factor $\alpha$
Thr	Threonin
Thr-ol	Threoninol
TNM	primary tumor, regional lymph nodes, distant metastasis (Klassifikationssystem von Neoplasien)
TOC	[Tyr <sup>3</sup> ]Octreotid
Trp	Tryptophan
TTP	time to peak
TVT	Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz
Tyr	Tyrosin
UICC	Union internationale contre le cancer
v. a.	vor allem
VALG	Veterans Administration Lung Cancer Study Group
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VOI	volume of interest
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
ZES	Zollinger-Ellison-Syndrom



## I. EINLEITUNG

Neuroendokrine Neoplasien stellen eine sehr heterogene Gruppe von neoplastischen Erkrankungen dar. Sie variieren nicht nur sehr in Lokalisation und hinsichtlich ihrer Symptomatik, sondern reichen auch von gut differenzierten, wenig malignen neuroendokrinen Tumoren (NET) bis hin zu schlecht differenzierten, hochgradig malignen neuroendokrinen Karzinomen (NEC) (Böcker et al., 2012a).

Mit etwa 5 Neuerkrankungen je 100.000 Menschen pro Jahr gehören die neuroendokrinen Neoplasien (NEN) zu den selteneren Tumoren, bei denen jedoch ein kontinuierlicher Anstieg in der Häufigkeit ihres Auftretens in den letzten Jahrzehnten verzeichnet wurde (Yao et al., 2008). Abhängig von der Lokalisation des Primärtumors bestehen große Variationen in der Inzidenz (Yao et al., 2008). Die Überlebensraten der Patienten sind neben der Dignität der Neoplasie auch stark von der Lokalisation abhängig. Während beispielsweise Patienten mit typischen Karzinoiden (TC) der Lunge eine 5-Jahres-Überlebensrate von 92–100 % aufweisen, reduziert sich diese bei Patienten mit kleinzelligen Lungenkarzinomen auf 5 % (Travis, 2010). Bei ilealen NET wird eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90 % verzeichnet, die auf 63 % für die Überlebenschancen nach 10 Jahren sinkt (Pape et al., 2008). Patienten mit Insulinomen können sogar durch eine Operation geheilt werden (Jensen, 2012). Die 5-Jahres-Überlebensrate von nicht funktionellen pankreatischen NET wird dagegen auf nur 65 % beziffert, die auf 45 % hinsichtlich der 10-Jahres-Überlebensrate sinkt (Klöppel, 2011). Die Chance für Patienten mit duodenalen Gastrinomen zu überleben, beträgt nach 10 Jahren 59 %, wohingegen Patienten mit pankreatischen Gastrinomen eine Überlebenschance von nur noch 9 % haben (Klöppel, 2011). An diesem Beispiel wird die Bedeutung der Tumorlokalisation für die Prognose mehr als deutlich.

Auch bei Haustieren werden NEN selten diagnostiziert. Insulinome sind bei Hunden, Katzen und Frettchen beschrieben, Gastrinome bei Hunden und Katzen. Patienten mit Insulinomen haben mit einer mittleren Überlebenszeit von 18 Monaten bei Hunden und 16 Monaten bei Frettchen eine bessere Prognose, als solche mit Gastrinomen mit durchschnittlich 4,8 Monaten Überlebenszeit (Ehrhart et al., 1996; Polton et al., 2007; Nelson & Couto, 2010a).

An diesen Zahlen ist ersichtlich, dass es für diverse Ausprägungen der neuroendokrinen Neoplasien keine kurativen Behandlungsoptionen gibt. Auf Zytostatika sprechen Mitteldarmkarzinoide, zu denen auch die am meisten verbreiteten ilealen NET zählen, im Gegensatz zu pankreatischen NET, nur in unbefriedigendem Maße an (Öberg, 2001; O'Toole et al., 2004).

Neuroendokrine Neoplasien stellen aufgrund ihrer Vielfalt in Hinblick auf Erscheinungsbild und Ausprägung sowie ihr Metastasierungsvermögen eine diagnostische und therapeutische Herausforderung in der Human- und in der Tiermedizin dar.

Das Charakteristikum der NEN Somatostatinrezeptoren, v. a. die Unterklasse sstr2, zu überexprimieren, wird sich sowohl für die Diagnostik als auch in der Therapie zu Nutze gemacht (Poeppel et al., 2011; Rinke & Arnold, 2014). Octreotid, ein Somatostatinanalogon, wird zur symptomatischen Behandlung von NET eingesetzt (Rinke & Arnold, 2014). Eine zusätzliche Schädigung der Tumorzellen konnte durch den Einsatz radioaktiv beladener Somatostatinanaloga wie [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid oder [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotat bewirkt werden (Esser et al., 2006). Diese spezifisch wirkende Therapie stellt eine hoffnungsvolle Behandlungsalternative für inoperable und metastasierte NET dar (Kwekkeboom et al., 2010). Als Hauptausscheidungsorgan der radioaktiven Somatostatinanaloga fungieren die Nieren, wodurch sie besonders strahlenexponiert sind. So stellen neben der Knochenmarkstoxizität die Nephrotoxizität die dosislimitierenden Faktoren dar (Forrer et al., 2007).

iRGD ist ein Peptid, das über das Zusammenwirken von  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinen mit Neuropilin-1-Rezeptoren einen internalisierenden Effekt an den Tumorzellen bewirkt (Sugahara et al., 2009; Teesalu et al., 2009). In präklinischen Studien konnte durch dessen Koadministration eine signifikante Mehranreicherung diverser Zytostatika im Tumorgewebe und eine Steigerung des therapeutischen Effekts erreicht werden (Sugahara et al., 2010; Akashi et al., 2014).

Im Rahmen dieser Dissertation sollte erforscht werden, ob mit dem iRGD eine vergleichbare Effizienzsteigerung hinsichtlich der therapeutischen Wirkung erzielt werden kann, wenn es dem [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid koadministriert wird.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Neuroendokrine Neoplasien**

#### **1.1 Gemeinsamkeiten neuroendokriner Neoplasien**

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) haben ihren Ursprung in Zellen des disseminierten neuroendokrinen Systems. Solche Zellen finden sich in Lunge, Magen, Darm, Pankreas, Urogenitalsystem und Haut (Klöppel, 2011; Böcker et al., 2012a). Sie werden als neuroendokrin bezeichnet, da sie zum einen Peptidhormone sowie biogene Amine produzieren und sezernieren und zum anderen eine verwandtschaftliche Beziehung zu neuronalen Zellen besteht (Allolio & Schulte, 2010; Klöppel, 2011). Unter den neuroendokrinen Markern besitzen Chromogranin A und Synaptophysin die größte Relevanz für die Diagnose neuroendokriner Neoplasien (Wiedenmann et al., 1986; Lloyd, 2003; Jensen, 2012). Werden die beiden neuroendokrinen Marker immunhistochemisch nachgewiesen, gilt die Diagnose einer NEN als gesichert (Allolio & Schulte, 2010). Chromogranin A wird zudem auch als im Blut zirkulierender Biomarker genutzt (Jensen, 2012). Die als zytosolischer Marker herangezogene neuronenspezifische Enolase (NSE) gilt als sensitiv, jedoch nicht als sehr spezifisch, und findet sich am häufigsten bei weniger differenzierten NEN (Lloyd, 2003; Jensen, 2012).

Es wird davon ausgegangen, dass die Zellen des disseminierten neuroendokrinen Systems ihren Ursprung in ortsständigen Stammzellen haben (Klöppel, 2011; Böcker et al., 2012a). Daher verhalten sich die NEN in ihrer klinischen Symptomatik recht heterogen. Je nach Ausgangszelle produzieren die neoplastischen Zellen diverse Peptidhormone und biogene Amine, die in membranbegrenzten Granula gespeichert werden und anhand derer die unterschiedlichen Zellen auch immunhistochemisch identifiziert und typisiert werden können (Böcker et al., 2012a). Werden die Amine oder Peptidhormone unkontrolliert freigesetzt, zeigen sich charakteristische klinische Syndrome. In solchen Fällen wird von funktionell aktiven Tumoren gesprochen (Allolio & Schulte, 2010; Jensen, 2012). Die Sekretion kann auf parakrinem Weg über das Interstitium zu eng benachbarten Zellen erfolgen oder hämatogen zu weiter entfernten Zielzellen auf endokrinem Weg (Böcker et al., 2012a). Allerdings ist

die größere Zahl der NEN (50–70%) funktionell inaktiv und stellt einen Zufallsbefund dar (Allolio & Schulte, 2010).

Ein für die Diagnostik und Therapie sehr bedeutsame Gemeinsamkeit der NEN ist die Eigenschaft, dass sie in der Regel eine hohe Dichte an Somatostatinrezeptoren aufweisen (Reubi et al., 2000). Fünf transmembranöse Rezeptorsubtypen (sstr1 bis sstr5) sind bekannt, wobei bei Subtyp sstr2 die gesplitteten Varianten sstr2A und sstr2B existieren (Patel & Srikant, 1997). Das Vorkommen von Somatostatinrezeptoren wird bei 80–100 % der neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET) beschrieben (Reubi, 2007). Beim kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) existieren Zahlen zwischen 50 und 75 % bezüglich des Somatostatinrezeptorvorkommens für etablierte Zelllinien und Tumorbiopsien von Patienten (Bogden et al., 1990; Reubi et al., 1990; Macaulay et al., 1991). In einer anderen Studie konnten mittels  $^{111}\text{In}$ -[DTPA-Phe<sup>1</sup>]-Octreotid-Szintigraphien sogar bei 100 % der untersuchten Patienten mit SCLC Somatostatinrezeptoren nachgewiesen werden (Krenning et al., 1993). Beachtet werden muss immer, welcher Rezeptor der sstr-Subtypen tatsächlich von den Zellen des jeweiligen Tumors exprimiert wird und in welcher Dichte und Verteilung er dort vorkommt (Reubi et al., 2001). Allgemein kann behauptet werden, dass der sstr2 der am häufigsten auf neuroendokrinen Tumoren exprimierte Subtyp ist (Hofland & Lamberts, 2001; Reubi et al., 2001; Reubi & Waser, 2003). Danach folgen etwa gleichermaßen sstr1 und sstr5, dann in absteigender Reihenfolge sstr3 und sstr4 (Reubi & Waser, 2003; Reubi, 2007). Weiter muss beachtet werden, dass die alleinige Anwesenheit der mRNA für die diversen Rezeptoren nicht gleichbedeutend mit der Expression des eigentlichen Rezeptors auf der Zelloberfläche ist (Fisher et al., 1998; Reubi et al., 2001; Kulaksiz et al., 2002). Es konnte autoradiographisch nachgewiesen werden, dass NEN des Dünndarms, funktionelle NEN der Pankreas sowie Bronchialkarzinoide und kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC) auf der Oberfläche tatsächlich vornehmlich sstr2 exprimieren sowie daneben auch die Rezeptorsubtypen sstr1 und sstr5 aufwiesen (Reubi et al., 2001; Reubi & Waser, 2003). Anhand immunhistochemischer Untersuchungen von Gastrinomen (Pankreas und Duodenum), Insulinomen, Dünndarmtumoren mit Karzinoidsyndrom und einigen Lebermetastasen konnte eine prozentuale Verteilung der verschiedenen Rezeptortypen ermittelt werden (siehe Tabelle 1) (Kulaksiz et al., 2002).

**Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Somatostatinrezeptor-Subtypen**

sstr: Somatostatinrezeptor; Tabelle nach Kulaksiz et al., 2002

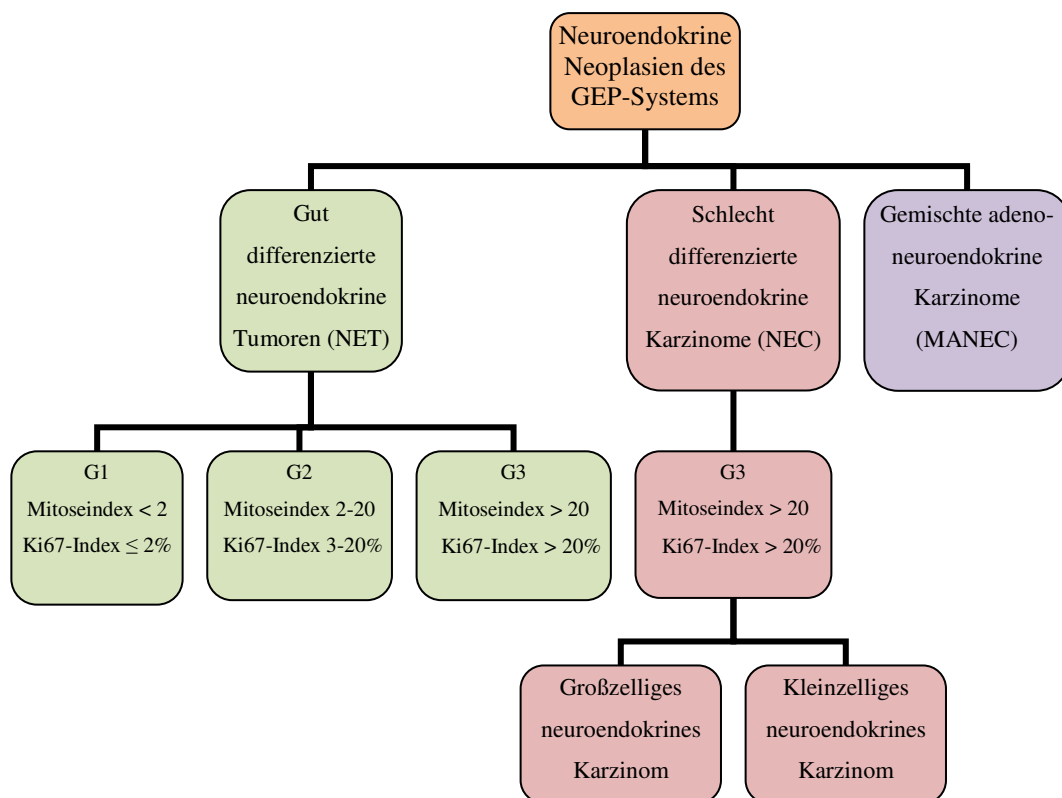
Tumore	Vorkommen der Rezeptorsubtypen in %			
	sstr1	sstr2A	sstr3	sstr5
Gastrinom	30	100	79	76
Insulinom	31	58	78	78
Karzinoid	37	86	71	83

## 1.2 Einteilung neuroendokriner Neoplasien

Unter allen malignen Neoplasien haben die NEN einen Anteil von 2 % (Böcker et al., 2012a). Darunter zeigen die GEP-NET mit ca. 64 % das häufigste Auftreten. An zweiter Stelle mit rund 28 % stehen die neuroendokrinen Tumoren des Bronchialsystems (Modlin et al., 2003). Neben ihren unterschiedlichen Sekretionsprodukten variieren sie in Lokalisation, Größe, Infiltrationstiefe, Differenzierungsgrad und vor allem auch in ihrer Tendenz zu metastasieren (Klöppel, 2011; Böcker et al., 2012a). NEN sind in den meisten Fällen zwar langsam wachsende, gut differenzierte Tumoren (bezeichnet als NET), jedoch existieren auch sehr aggressiv wachsende Ausprägungen, die dann zu den schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (bezeichnet als NEC) gehören (Klöppel, 2011; Böcker et al., 2012a).

Die Klassifikation der NEN durch die WHO (World Health Organization), das Grading und das Staging über die TNM-Klassifikation (primary tumor, regional lymph nodes, distant metastasis) sind ausschlaggebend für das therapeutische Vorgehen und für prognostische Vorhersagen (Horn et al., 2012; Jensen, 2012; Rinke & Arnold, 2014). Es existieren TNM-Klassifikationen verschiedener Organisationen. Für die GEP-NET haben sowohl die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) als auch die Union internationale contre le cancer (UICC) und das American Joint Committee on Cancer (AJCC) eine TNM-Klassifikation erarbeitet (Rindi et al., 2006; Rindi et al., 2007; Rindi et al., 2012). Für die Einteilung der Stadien pulmonaler NET steht ebenfalls ein TNM-System der UICC/AJCC zur Verfügung und wird für das TC und AC angeraten (Travis, 2010; Kleindienst et al., 2016). Eine Stadieneinteilung beim SCLC kann zudem über die TNM-Klassifikation für nichtkleinzellige Lungenkarzinome der IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) oder über die Einteilung der VALG (Veterans Administration Lung Cancer Study Group), bei der eine „Limited Disease“ (LD), eine „Extended Disease“ (ED) und eine „Very limited Disease“ unterschieden werden, erfolgen. (Horn et al., 2012).

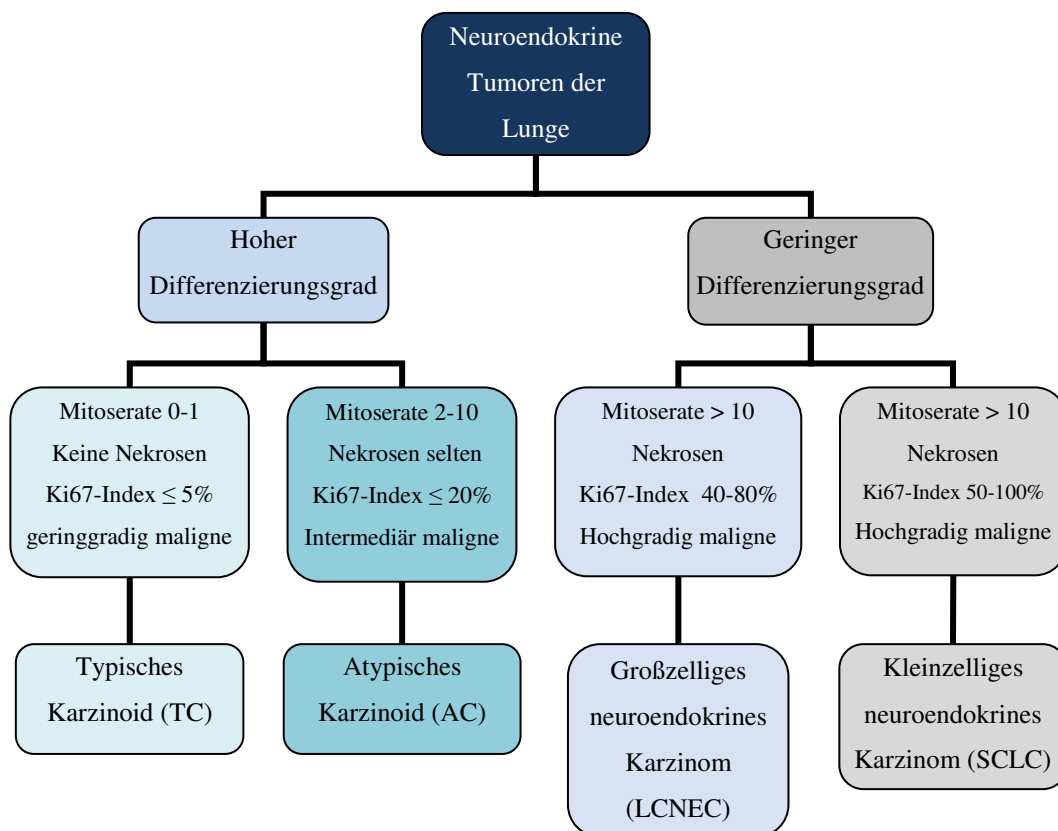
Die aktuelle WHO-Klassifikation für NEN des gastroenteropankreatischen Systems aus dem Jahr 2010 zieht die histopathologischen Merkmale für eine Untergliederung heran (Klöppel et al., 2004; Klöppel, 2011; Jensen, 2012). Diese Einteilung, in der sich der Begriff „neuroendokrine Neoplasien“ zu einem Überbegriff für alle Neoplasien, deren Ursprung neuroendokrine Zellen sind, etabliert hat, erfolgte auf der Annahme, dass alle GEP-NEN grundsätzlich maligne sind, sich aber in der Tendenz, Metastasen zu bilden, unterscheiden. Die Zuordnung zu den NEN beruht seit dem offiziell auf der Eigenschaft, dass sich für die tumorbildenden Zellen die charakteristischen neuroendokrinen Marker nachweisen lassen (Klöppel, 2011). NEN unterteilen sich in gut differenzierte neuroendokrine Tumoren (NET) und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC). Eine weitere Einstufung in ein Grading-System erfolgt auf Basis ihres Proliferationsindex (Klöppel, 2011) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Veranschaulichung der WHO-Klassifizierung der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien und des angewendeten Grading-Systems**

Basis hierfür stellt der Differenzierungsgrad, Proliferationsindex (Ki-67-Index in %) und die Mitoserate (Anzahl der Mitosen pro 10 High Power Fields (HPF)). Sind G3-Tumoren gut differenziert, werden sie als NET bezeichnet, andernfalls als NEC. Graphische Aufarbeitung von Informationen aus Klöppel, 2011; Jensen, 2012; Rinke & Arnold, 2014

Gemäß der aktualisierten WHO-Klassifizierung für Tumoren der Lunge von 2015, wurden das typische Karzinoid, das atypische Karzinoid und die beiden neuroendokrinen Lungenkarzinome, darunter das kleinzellige (SCLC) und das großzellige (LCNEC), in der Kategorie „neuroendokrine Tumoren“ zusammengefasst (Travis et al., 2015). Als neuroendokrine Marker zählen hier Chromogranin A, Synaptophysin und das neurale Zelladhäsionsmolekül CD56 (Travis et al., 2015). Bei dieser Kategorisierung sind der Differenzierungsgrad, die Mitoserate und die Ausbildung von Nekrosen wichtige Kriterien (siehe Abbildung 2) (Kleindienst et al., 2016). Das Vorgehen bei der Bestimmung der Mitoserate wurde bei der neuen WHO-Klassifizierung genauer definiert, da dies ein essentielles Verfahren darstellt, um die Karzinoidtumoren untereinander sowie diese von den Karzinomen zu differenzieren. Die Mitoseraten sollten in Bereichen der höchsten Zellaktivität und in einer Fläche von 2 mm<sup>2</sup> ausgezählt werden (Travis et al. 2015). Der Proliferationsindex Ki-67 ist ebenfalls ein wichtiges immunhistochemisches Differenzierungswerkzeug für die Abgrenzung zwischen Karzinoidtumoren und den Karzinomen (Pelosi et al., 2014) (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Einteilung neuroendokriner Lungentumoren**

Graphische Darstellung nach Informationen von Travis, 2010; Caplin et al., 2015; Travis et al. 2015 und Kleindienst et al., 2016

### 1.3 Neuroendokrine Neoplasien des gastrointestinalen Systems

Es werden drei Typen von gut differenzierten NET des Magens und eine schlecht differenzierte Ausprägung in Form eines NEC beschrieben (Rindi et al., 1999). Typ I und Typ II der gastralen NET entwickeln sich aus entarteten hyperplastischen ECL-Zellen (Gastric Enterochromaffin-like Cells), deren Veränderung eine länger bestehende Hypergastrinämie zu Grunde liegt (Klöppel et al., 2004; Plöckinger et al., 2004). Der dritte, sporadisch entstehende Typ, stellt sich meist als solitärer aus ECL-Zellen bestehender Tumor dar, der bei Diagnosestellung häufig schon metastasiert hat (Klöppel et al., 2004). Als vierter Typ seien noch die seltenen und schlecht differenzierten kleinzelligen NEC genannt, die sich als große ulzerierende Knoten darstellen und sich bei der Diagnosestellung häufig bereits in einem fortgeschrittenen Stadium mit ausgeprägter Metastasierung befinden (Klöppel, 2011).

Im Duodenum und oberen Jejunum kommen u. a. sowohl nichtfunktionelle NET ohne spezifische Syndrome vor, wie etwa Somatostatinome, gastrin-, serotonin- oder calcitoninproduzierende NET und schlecht differenzierte NEC, als auch Gastrinome mit der Symptomatik eines Zollinger-Ellison-Syndroms (ZES; peptische Ulkuskrankheit, Abdominalschmerzen, wässrige Diarrhöen, gastroösophageale Refluxkrankheit) (Klöppel et al., 2004; Allolio & Schulte, 2010; Klöppel, 2011).

NET des Ileums sind zumeist gut differenzierte Tumoren, die bei Diagnosestellung jedoch häufig bereits in die Lymphknoten und in die Leber metastasiert haben (Klöppel, 2011). Dem sog. Karzinoidsyndrom, das bei bestehenden Lebermetastasen auftritt, liegt die Sekretion von Serotonin und anderen Mediatoren zu Grunde. Diese kann bei längerem Bestehen eine Endokardfibrose des rechten Herzens verursachen (Klöppel, 2011; Böcker et al., 2012a).

Die zumeist gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren des Appendix werden meist als Zufallsbefund im Rahmen einer akuten Appendizitis diagnostiziert, da eine hormonbedingte Symptomatik selten ist (Klöppel et al., 2004; Klöppel, et al., 2007). Im Rektum sind häufiger gut differenzierte NET lokalisiert, wohingegen schlecht differenzierte NEC öfter im Kolon auftreten (Klöppel et al., 2007). Tabelle 2 gibt eine Übersicht zum prozentualen Auftreten der gastrointestinalen NET an den verschiedenen Lokalisationen des gastroenteropankreatischen Systems.



**Tabelle 2: Prozentuales Vorkommen von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren innerhalb der neuroendokrinen Tumoren des Verdauungstraktes**

Angaben des SEER-Programms (SEER: Surveillance, Epidemiology, and End Results) aus Datenbanken des Nationalen Cancer Institutes, USA; Tabelle nach Modlin et al., 2003

Lokalisation	1973-1999	1992-1999
Magen	7,16 %	8,66 %
Dünndarm	44,38 %	41,78 %
Duodenum	4,36 %	5,67 %
Jejunum	2,82 %	2,20 %
Ileum	23,20 %	19,76 %
Appendix	7,42 %	3,59 %
Colon	13,41 %	11,28 %
Rektum	21,17 %	27,45 %

## 1.4 Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas

### 1.4.1 Anatomie und Funktionen des Pankreas bei Mensch und Tier

Bezüglich der Nomenklatur für das Pankreas gibt es in der Humanmedizin und in der Tiermedizin Unterschiede. So unterteilt man das Pankreas beim Menschen in den Pankreaskopf (Caput mit Processus uncinatus), Pankreaskörper (Corpus) und den Pankreasschwanz (Cauda). Bei den Haussägetieren hingegen wird das Pankreas in einen Körper (Corpus pancreatis) und von diesem ausgehend in zwei Schenkel oder Lappen (Lobus pancreatis sinister und Lobus pancreatis dexter) unterteilt (Nickel et al., 2004).

Das Pankreas vereint sowohl beim Menschen als auch beim Tier einen exokrinen und einen endokrinen Teil (Nickel et al., 2004). Das exokrine Pankreas macht den weitaus größeren Anteil dieses Organs aus. Er ist für die Sekretion von Verdauungsenzymen verantwortlich. Es werden Peptidasen, Nucleasen, Amylase und Lipasen sezerniert (Voigt, 1996, Scharrer & Wolffram, 2005). Der endokrine Teil des Pankreas wird durch die Langerhans-Inseln repräsentiert. Sie machen nur etwa 1–2 % des Pankreasgewebes aus und setzen sich aus vier unterschiedlichen Zelltypen zusammen, die unterschiedliche Peptidhormone produzieren (siehe Tabelle 3) (Voigt, 1996; Salomon et al., 2004; Möstl, 2005).

**Tabelle 3: Übersicht der funktionellen endokrinen Zellen des Pankreas**

Informationen zusammengestellt aus Klinka & Silbernagel, 1996; Salomon et al., 2004; Möstl, 2005; Böcker et al., 2012a

Zelltyp	Häufigkeit in %	Sekretionsprodukt	Funktion
A-Zellen ( $\alpha$ -Zellen)	Mensch: 20 Tier: 10–20	Glukagon	Anregung von: Glykogenolyse, Glukoneogenese, Lipolyse
B-Zellen ( $\beta$ -Zellen)	Mensch: 60–70 Tier: 60–80	Insulin	Senkung des Blutzuckerspiegels
D-Zellen ( $\delta$ -Zellen)	Mensch: 10–15 Tier: 5–10	Somatostatin	vielfältig hemmendes Peptidhormon
PP-Zellen	Mensch: keine Angabe Tier: 3–10	pankreatisches Polypeptid	hemmt Sekretion von Pankreassekreten

**1.4.2 Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas beim Menschen**

Die pankreatischen NEN werden synonym auch als endokrine Pankreastumoren oder Inselzelltumoren bezeichnet (Jensen, 2012). Innerhalb der NEN des gastroenteropankreatischen Systems haben die pankreatischen NEN (panNEN) etwa einen Anteil von 1 % (Modlin et al., 2003). Sie sind zumeist solitär auftretende, gut abgegrenzte und gut differenzierte pankreatische NET (panNET), die in funktionelle und nichtfunktionelle panNET unterteilt werden (Klöppel, 2011). Die nichtfunktionellen NET belegen hierbei einen Anteil von 60 % (Klöppel, 2011). Die Bezeichnung „nichtfunktionell“ bezieht sich auf die Abwesenheit von spezifischen Syndromen, da die sezernierten Peptidhormone, wie z.B. das pankreatische Polypeptid, keine spezielle Symptomatik hervorrufen (Böcker et al., 2012a). Bei diesen Tumoren entstehen vielmehr die Symptome aufgrund ihrer Größe und Ausbreitung sowie einer gegebenenfalls erfolgten Metastasierung (Klöppel et al., 2007). Die panNET umfassen Tumoren, die ausschließlich im Pankreas lokalisiert sind, wie Insulinom, Glukagonom oder die nichtfunktionellen Pankreastumoren, sowie Tumoren, die auch an extrapankreatischen Lokalisationen vorkommen können, wie Gastrinom, VIPom (VIP: vasoaktives intestinales Peptid) und Somatostatinom (Jensen, 2012). Die Häufigkeit des Vorkommens funktioneller panNET zeigt Tabelle 4. Mit Ausnahme des Insulinoms liegt bei allen im Folgenden beschrieben panNEN eine potentiell hohe Malignität vor, da eine große Wahrscheinlichkeit für eine bereits erfolgte Metastasierung in Lymphknoten und Leber zum Zeitpunkt der Diagnosestellung besteht (Klöppel et al., 2007; Jensen, 2012).

**Tabelle 4: Prozentuales Vorkommen der funktionellen neuroendokrinen Tumoren im Pankreas**

VIP: vasoaktives intestinales Peptid; Tabelle nach O'Toole et al., 2006

Insulinom	17 %
Glukagonom	15 %
Gastrinom	1%
VIPom	2%
Somatostatinom	1%

Insulinome stellen solitär auftretende und gut abgegrenzte Tumoren dar und kommen ausschließlich im bzw. dem Pankreas angelagert vor (Klöppel et al., 2007). Nur etwa 5–15 % von ihnen sind maligne. Sie entstehen aus den B-Zellen, welche schließlich autonom und unkontrolliert Insulin produzieren. Auf die dadurch entstehende Hypoglykämie sind auch die häufigsten klinischen Symptome zurückzuführen. Weitere Symptome werden durch eine exzessive Katecholaminausschüttung im Rahmen einer adrenergen Gegenregulation verursacht (Jensen, 2012).

Gastrinome treten zwar im Pankreas auf, allerdings sind sie häufiger im Duodenum lokalisiert (Jensen, 2012). Bei einem Gastrinom erfolgt eine autonome, gesteigerte Gastrinsekretion der Parietalzellen, was zu einer Magensäurehypersekretion mit Zollinger-Ellison-Syndrom führt (Allolio & Schulte, 2010; Jensen, 2012).

Zu den sehr seltenen pankreatischen NEN zählen das VIPom, das Glukagonom und das Somatostatinom. Die beiden ersteren sezernieren in großem Maße das jeweilig namensgebende und Symptomatik bedingende vasoaktive intestinale Peptid (VIP) bzw. Glukagon (Jensen, 2012). Dagegen agieren Somatostatinome zumeist als nichtfunktionelle NET (Garbrecht et al., 2008).

### **1.4.3 Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas bei Tieren**

Insulinome treten bei Hunden und Frettchen selten auf, bei der Katzen sind sogar nur fünf Fälle bekannt (Hawks et al., 1992; Green & Bright, 2008). Die beiden neuroendokrinen Marker Chromogranin A und die neuronenspezifische Enolase wurden bei Insulinomen der Katze nachgewiesen (Hawks et al., 1992; Jackson et al., 2009). Bei caninen Insulinomen ist bekannt, dass diese Somatostatinrezeptoren aufweisen (Robben et al., 1997).

Insulinome beim Hund und auch bei der Katze werden, anders als beim Menschen, als maligne Neoplasien eingestuft, da sie stark zur Metastasierung neigen (Green & Bright, 2008). Bei den meisten Hunden sind zum Diagnosezeitpunkt bereits Metastasen in den regionalen Lymphknoten, in der Leber oder im peripankreatischen Mesenterium zu verzeichnen (Nelson & Couto, 2010a). Bei Frettchen scheinen die Insulinome weniger zu metastasieren, allerdings rezidivieren sie augenscheinlich eher an der gleichen Stelle (Ehrhart et al., 1996).

Bei den genannten Tierarten handelt es sich beim Insulinom um eine funktionelle Neoplasie der B-Zellen, die autonom vermehrt Insulin produzieren, was eine Hypoglykämie zur Folge hat (Nelson & Couto, 2010a). Die Symptomatik entsteht, wie auch beim humanen Insulinom, durch die Hypoglykämie und eine erhöhte Katecholaminausschüttung. Bei Hunden und Katzen äußert sich dies v. a. in Anfällen, Schwäche, Lethargie, Kollaps, Ataxie, Muskelfaszikulationen und Verhaltensänderungen (Green & Bright, 2008; Nelson & Couto, 2010a). Beim Frettchen wird zusätzlich Ptyalismus aufgeführt (Ehrhart et al., 1996).

Zur Diagnosestellung dienen die sonographische Untersuchung oder auch die Laparotomie sowie eine anschließende histologische bzw. immunhistologische Untersuchung des entnommen Gewebes (Boretti, 2008; Nelson & Couto, 2010a). In einer Studie von Robben und Kollegen (2005) stellte sich die Computertomographie (CT) für das Auffinden der Primärtumore gegenüber der sonographischen Untersuchung oder der Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) überlegen dar. Jedoch gab es hinsichtlich des Auftretens von Metastasen bei der CT viele falsch positive Ergebnisse (Robben et al., 2005).

Die chirurgische Entfernung des Tumors ist das therapeutische Mittel der Wahl. Daneben können ein Fütterungsregime, das häufigeres Füttern spezieller Diätfuttermittel beinhaltet, sowie eine Reihe an Medikamenten, wie Prednisolon, Diazoxid, Octreotid und Streptozotocin, das gezielt die B-Zellen des Pankreas zerstört, eingesetzt werden (Polton et al., 2007; Nelson & Couto, 2010a). Bei Katzen scheint genanntes Fütterungsregime und die medikamentöse Behandlung weniger erfolgreich zu sein als bei Hunden (Green & Bright, 2008).

Gastrinome kommen bei Hunden und Katzen gleichermaßen sehr selten vor (Fossum, 2009). Es handelt sich hierbei um äußerst maligne Gastrin sezernierende Tumoren, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist bereits in das lymphatische System gestreut haben. Zudem treten Metastasen in Leber, Milz und im Mesenterium auf (Fossum, 2009; Nelson & Couto, 2010a). Bei betroffenen Tieren stehen die Hauptsymptome wie Vomitus, Anorexie, Lethargie, Gewichtsverlust, Diarrhö, aber auch Hämatemesis und Meläna in Zusammenhang mit dem Zollinger-Ellison-Syndrom (Shaw, 1988; Fossum, 2009). Abdominale Schmerzen hingegen gehören nicht zu den regelmäßig vorkommenden Symptomen (Fossum, 2009). Die endoskopische Untersuchung ist das diagnostische Mittel der Wahl. Zumeist sind eine Ösophagitis und Ulzerationen, bevorzugt im Kardiabereich des Magens und Duodenums, sowie eine verdickte Magenschleimhaut erkennbar (Fossum, 2009; Nelson & Couto, 2010a; Gal et al., 2011). Eine belastbare Diagnose kann mittels histologischer bzw. immunzytochemischer Untersuchung gestellt werden (Nelson & Couto, 2010a; Gal et al., 2011). Als Therapie empfiehlt sich eine chirurgische Entfernung des neoplastischen Gewebes sowie ein operatives Herangehen bei bereits bestehenden Ulzerationen. Des Weiteren muss die Hypersekretion der Magensäure medikamentös unterbunden werden (Fossum, 2009; Nelson & Couto, 2010a).

### **1.5 Neuroendokrine Neoplasien des bronchopulmonalen Systems**

Das typische Karzinoid (TC) und das atypische Karzinoid (AC) kommen sowohl im peripheren als auch im zentralen Lungengewebe vor, wobei sich respiratorische Symptome zumeist nur bei zentralem Auftreten zeigen. Periphere Karzinoide stellen im Allgemeinen bei Symptomlosigkeit einen Zufallsbefund dar (Caplin et al., 2015). Das TC und das AC machen zusammen nur einem Anteil von 1 bis 2 % an allen invasiven malignen Lungenveränderungen aus, wobei das AC mit 0,1–0,2 % das deutlich seltenere Karzinoid ist (Travis, 2010). Das mit einem Vorkommen von 2,1 bis 3,5 % ebenfalls seltene großzellige neuroendokrine Lungenkarzinom tritt primär in peripheren Bereichen der Lunge auf (Oshiro et al., 2004; Fasano et al., 2015). Das SCLC kommt mit 15–20 % am häufigsten vor (Travis, 2010). Seinen Namen verdankt es seinen charakteristischen Zellen mit kleinem hyperchromatischem Zellkern und schmalem Zytoplasma (Böcker et al., 2012b; Horn et al., 2012). Der Primärtumor des SCLC erscheint zumeist als zentrale Raumforderung mit Wachstum ins endobronchiale System (Horn et al., 2012). Das SCLC ist bei Diagnosestellung bereits als fortgeschritten anzusehen, da eine frühe Metastasierung charakteristisch ist (Hasskarl et al., 2010). Symptome wie Husten, Dyspnoe, Hämoptysen (blutiger Auswurf), poststenotische Pneumonien und das Vena-cava-superior-Syndrom sind auf die zentrale oder die endobronchiale Ausbreitung des Primärtumors zurückzuführen (Horn et al., 2012). Bei Sitz des Tumors an der Lungenspitze mit lokaler Ausbreitung und Infiltration der Thoraxwand kann es zum sog. Pancoast-Syndrom kommen, das mit der Destruktion der 1. und 2. Rippe und des 1. Brustwirbels sowie der Schädigung von zervikalen Nervenwurzeln und dem Horner-Syndrom einhergeht (Hasskarl et al., 2010; Horn et al., 2012). Beim SCLC treten paraneoplastische Syndrome, bedingt durch die Produktion von Peptidhormonen, verglichen mit den anderen NET der Lunge, am häufigsten auf (Kleindienst et al., 2016).

## 1.6 Diagnostik und Therapie

Das diagnostische Vorgehen umfasst eine ausführliche Anamnese, die Bestimmung von Laborwerten, Tumormarkern sowie bildgebende Verfahren und pathohistologischen Untersuchungen von Biopaten zur Sicherung des Befundes (Allolio & Schulte, 2010; Horn et al., 2012; Rinke & Arnold, 2014). Bei funktionellen NET werden, je nach vorliegendem Syndrom, charakteristische Parameter bestimmt (Jensen, 2012). Die Bildgebung zur Lokalisierung und Ausbreitung der Tumore findet über sonographische und endoskopische Untersuchungen sowie kontrastmittelverstärkte Computer- und Magnetresonanztomographie statt (Rinke & Arnold, 2014; Kleindienst et al., 2016). Bei Lungentumoren wird letztgenanntes Verfahren auch zur Abklärung von Gehirnmetastasen angewendet (Caplin et al., 2015). Nuklearmedizinische PET/CT-Untersuchungen (PET: Positronen-Emissions-Tomographie) mit  $^{68}\text{Gallium-DOTATOC}$  oder  $^{68}\text{Gallium-DOTATATE}$  oder auch Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphien beruhen auf der Anwesenheit von Somatostatinrezeptoren auf der Tumoroberfläche (Poeppel et al., 2011).

Die Therapiemöglichkeiten von GEP-NEN reichen von einer chirurgischen Intervention über den Einsatz von synthetischen Somatostatinderivaten und Interferon- $\alpha$  zur symptomatischen und antiproliferativen Therapie, bis hin zur Behandlung mit Zytostatika (Rinke & Arnold, 2014). Zudem besteht die Möglichkeit der nuklearmedizinischen Behandlung von metastasierten inoperablen NEN mit an Somatostatinanaloga gekoppelten Radionukliden, meist in der Kombination  $^{90}\text{Yttrium-DOTATOC}$  oder  $^{177}\text{Lutetium-DOTATATE}$ . (Allolio & Schulte, 2010; Rinke & Arnold, 2014).

Bei SCLC wird mit einer Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie behandelt. Zudem empfiehlt sich beim SCLC eine prophylaktische Schädelbestrahlung (Hasskarl et al., 2010; Horn et al., 2012). Rezidivierende SCLC weisen häufig eine verringerte Sensibilität oder gar Resistenz gegenüber eingesetzten Zytostatika auf (Böcker et al., 2012b; Horn et al., 2012). Anders als beim TC und AC kann aufgrund bereits ausgedehnter Metastasierung bei Diagnosestellung der Großteil der LCNEC nicht chirurgisch behandelt werden und auch beim SCLC empfiehlt sich ein operatives Herangehen nur in äußerst seltenen Fällen (Caplin et al., 2015; Kleindienst et al., 2016).

### **1.7 Tumormodelle mit neuroendokrinen Eigenschaften**

In der präklinischen onkologischen Forschung finden verschiedene Tumorzelllinien in orthotopen oder subkutanen Mäuse- oder Rattenmodellen ihren Einsatz. Die gut etablierte amphikrine Zelllinie AR42J hat ihren Ursprung als Azaserin-induziertes Pankreasadenokarzinom der Ratte (Longnecker & Curphey, 1975). Sie vereint sowohl exokrine als auch neuroendokrine Eigenschaften (Rosewicz et al., 1992). So können bei ihr, neben anderen neuroendokrinen Charakteristika, die essentiellen neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A festgestellt werden (Rosewicz et al., 1992; Hofslis et al., 2002). Als sog. permanente Zelllinie lässt sie sich unbegrenzt kultivieren, ohne dabei ihre Eigenschaften zu verlieren (Rosewicz et al., 1992; Schmitz, 2011). Zu diesen Eigenschaften zählen auch die zuverlässig, in hoher Konzentration exprimierten und funktionellen Somatostatinrezeptoren sstr2 und auch die Expression von sstr5 (Viguerie et al., 1988; Taylor et al., 1994; Hofslis et al., 2002). Diese Zelllinie wird verbreitet in präklinischen Studien zur Erforschung von Möglichkeiten für Diagnostik und Therapie mit Somatostatinanaloga verwendet (Miederer et al., 2008; Stelter et al., 2008; Graf et al., 2014).

Als ein Vertreter des kleinzelligen Lungenkarzinoms mit neuroendokrinen Eigenschaften wurde u. a. die NCI-H69 als permanent kultivierbare Zelllinie etabliert (Gazdar et al., 1980). So kann bei der kommerziell erhältlichen NCI-H69-Zelllinie auch weiterhin der wichtige neuroendokrine Marker Chromogranin A nachgewiesen werden (Gazdar et al., 1988). Außerdem erweist sie sich als eine Zelllinie mit einer hohen Dichte funktioneller Somatostatinrezeptoren (sstr2) (Taylor et al., 1988; Taylor et al., 1994). Daher findet diese Zelllinie ebenfalls häufig Anwendung in der präklinische Forschung (Onn et al., 2003; Schmitt et al., 2003; Erlandsson et al., 2011; Lewin et al., 2015).



## **2. Diagnostik und Therapie in der Nuklearmedizin**

Die Nuklearmedizin bietet sowohl Möglichkeiten für die bildgebende Diagnostik als auch für die Therapie von Tumorerkrankungen. Hierfür werden sog. Radiopharmaka, die als Radiotracer fungieren, eingesetzt (Schicha & Schober, 2013a). Beim Tracerprinzip ist entscheidend, dass durch den Austausch eines stabilen Atoms mit einem entsprechenden radioaktiven Isotop keine Änderung im biochemischen Verhalten der Verbindung eintritt (Bartenstein et al., 2011). Radiopharmaka (Radiotracer) bestehen zum einen aus einem Molekül, das die spezifische Bindung an vorliegende Strukturen, wie z. B. Rezeptoren, oder eine Metabolisierung des Tracers ermöglicht. Der zweite Bestandteil stellt ein an die chemische Substanz gebundenes radioaktives Isotop dar, das für die Anwendung in der Diagnostik eine messbare  $\gamma$ - oder  $\beta^+$ -Strahlung aussendet (Bartenstein et al., 2011; Schicha & Schober, 2013a). Für den therapeutischen Einsatz finden v. a. Radionuklide mit  $\beta^-$ -Zerfall Anwendung (Schicha & Schober, 2013a). Die in der Endoradiotherapie eingesetzten Radiopharmaka reichern sich entweder über metabolische Verstoffwechselung im Zielgewebe an, binden bei der Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) an spezifische Rezeptoren oder wirken bei der Radioimmuntherapie über markierte Antikörper (Bartenstein et al., 2011).

### **2.1 Strahlungsarten und Wirkung auf Materie**

#### **2.1.1 Grundlagen und Zerfallsarten**

Ein Nuklid bezeichnet die Atomkernart, die durch ihre Protonenzahl, Neutronenzahl und dadurch durch ihre Massezahl festgelegt wird (Hermann, 2004a; Schicha & Schober, 2013a). Isotope sind Atome, deren Protonenzahl (Ordnungszahl) gleich bleibt, die jedoch in ihrer Neutronenzahl variieren (Hermann, 2004a). Je nach Energiezustand können die Kerne stabil oder instabil sein. Bei instabilen Kernen werden diese Radioisotope genannt, bei denen ein für das Atom ungünstiger energetischer Zustand vorliegt. Man unterscheidet natürliche und künstlich hergestellte Radioisotope (Schlegel & Bille, 2002a). Die Aktivität einer bestimmten Menge eines Radioisotopes bezeichnet die Zerfälle pro Sekunde innerhalb dieser Menge. Die Einheit der Aktivität ist Becquerel (1 Bq = 1/s) (Schlegel & Bille, 2002a).

Es wird zwischen  $\alpha$ - Zerfall,  $\beta^+$  - und  $\beta^-$  -Zerfällen sowie  $\gamma$ -Strahlung unterschieden (Schlegel & Bille, 2002a). Beim  $\alpha$ -Zerfall wird ein Heliumkern  ${}^4\text{H}^{2+}$  ausgesendet. Liegt ein  $\beta^-$  -Zerfall vor, wandelt sich ein Neutron im Atomkern in ein Proton, ein Negatron (negatives Elektron) und ein sog. Antineutrino um (Schlegel & Bille, 2002a). Der  $\beta^+$ -Zerfall lässt aus einem Neutron ein Positron (positives Elektron) und ein Neutrino entstehen (Schlegel & Bille, 2002a). Die sog. Vernichtungsstrahlung von 1,022 MeV entsteht beim anschließenden Zerstrahlen eines jeden Positrons in ein Negatron und wird in Form von zwei genau entgegengesetzt emittierenden Photonen ( $\gamma$ -Quanten) mit je 511 keV freigesetzt. Photonen ( $\gamma$ -Strahlung) sind sich mit Lichtgeschwindigkeit vom Entstehungsort entfernende elektromagnetische Wellenpakete, die bei einer Vielzahl von Kernzerfällen einen Teil der freiwerdenden Zerfallsenergie darstellen. Der entstandene Tochterkern befindet sich in einem angeregten Zustand und gelangt durch die Aussendung von  $\gamma$ -Strahlung in einen niedrigeren Energiezustand oder in den Grundzustand zurück (Schlegel & Bille, 2002a).

### 2.1.2 Wechselwirkung mit Materie und biologische Strahlenwirkung

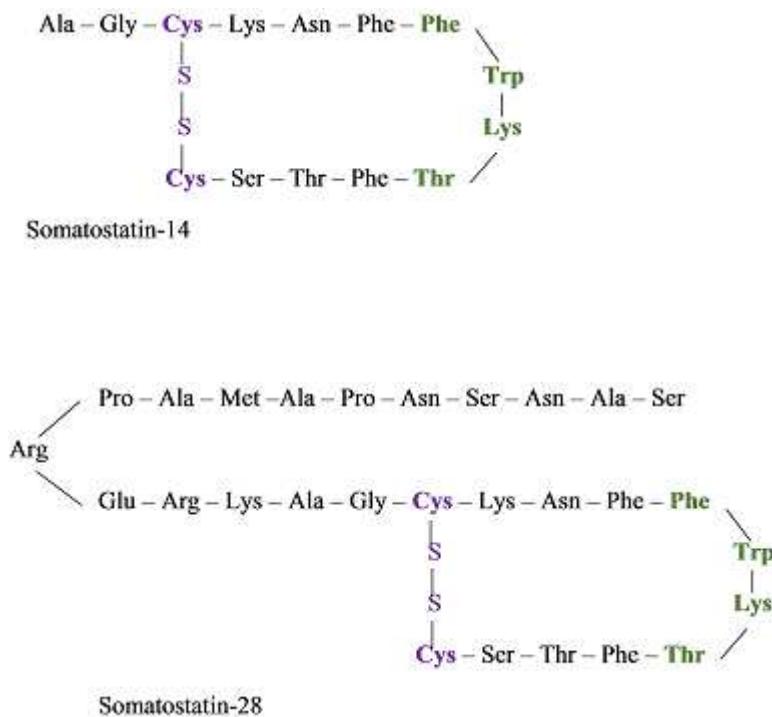
Die Energieübertragung auf Materie (Gewebe) erfolgt beim  $\alpha$ -Zerfall über Stöße mit Atomkernen. Die Energieübertragung beim  $\beta^-$ -Zerfall erfolgt dagegen über Elektronen, beim  $\beta^+$ -Zerfall über Positronen (Schicha & Schober, 2013a). Die Wirksamkeit einer Strahlung in biologischen Strukturen steht in starkem Zusammenhang mit ihrem linearen Energietransfer (LET). Er gibt über den Energieverlust der Strahlung pro zurückgelegte Wegstrecke (keV/ $\mu\text{m}$ ) im absorbierenden Gewebe Aufschluss. Je höher also der LET einer Strahlung ist, umso größer ist die biologische Wirkung bei gleicher Dosis (in Gray, Gy) (Knedlitschke & Weibezahn, 2002; Karstens et al., 2010). Die Wechselwirkung der  $\gamma$ -Strahlung mit Materie kann auf drei verschiedene Weisen erfolgen. Man unterscheidet Photoeffekt, Compton-Effekt und Paarbildung (Schicha & Schober, 2013a).

Die Energie aller beschriebenen Zerfallsarten reicht aus, um ein Elektron aus der Atomhülle hinaus zu katapultieren, wodurch das Atom ionisiert wird. Daher wird diese als ionisierende Strahlung bezeichnet (Schicha & Schober, 2013a). Auf zellulärer Ebene kann diese ionisierende Strahlung die Schädigung von DNA bewirken (Sauer, 2010), die sowohl direkt als auch indirekt erfolgen kann. Bei ersterer tritt ein biologischer Effekt am selben Molekül ein, das zuvor die Energie

absorbiert hat. Dagegen reagiert die Strahlung bei der indirekten Strahlenwirkung zunächst mit Wassermolekülen, was die Entstehung freier Wasserradikale zur Folge hat, die wiederum Veränderungen an Biomolekülen hervorrufen können (Sauer, 2010). Der DNA stehen Reparaturmechanismen zur Verfügung oder, bei irreparablen Schäden, kann die Apoptose eingeleitet werden (Sauer, 2010). Erfolgt jedoch keiner dieser Vorgänge, können sich pathologische Veränderungen wie bösartige Tumoren manifestieren (Schicha & Schober, 2013a). In der Nuklearmedizin wird der Effekt der ionisierenden Strahlung zur Schädigung von Tumorzellen gezielt über den therapeutischen Einsatz von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Strahlern mit ihrer kurzen Reichweiten genutzt (Schicha & Schober, 2013a).

## **2.2 Somatostatin und dessen Analoga**

Somatostatin ist ein im Körper weit verbreitetes zyklisches Peptidhormon, das seine hemmende Wirkung zum einen auf parakrinem Weg auf direkt benachbarte Zellen überträgt und zum anderen endokrin über den Blutweg auf weiter entfernte Zielorgane (Voigt, 1996). Es entfaltet seinen hemmenden Einfluss nahezu an jedem Organ im Körper, so u. a. auf Sekretionsvorgänge im Verdauungstrakt, auf sämtliche endokrine und exokrine Funktionen des Pankreas, als Neuromodulator an der Niere und als Neurohormon und Neurotransmitter im Nervensystem (Voigt, 1996; Barnett, 2003; Modlin et al., 2010). Die Signaltransduktion an den Somatostatinrezeptoren erfolgt über G-Proteine. Die diversen Sekretionsvorgänge können über vier mögliche Wege gehemmt werden: die Inhibierung von Adenylylcyclase, die Aktivierung von  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionenkanälen und der Anregung zweier Phosphatasen (Calcineurin und Serin/Threonin Phosphatase) (Patel & Srikant, 1997). Die hemmende Wirkung auf Wachstumshormone und die Einleitung der Apoptose erfolgen über zwei zusätzliche Wege, denen die Anregung der Protein-Thyrosin-Phosphatase voraus geht (Patel & Srikant, 1997). Somatostatin liegt in zwei biologisch aktiven Formen vor, dem Somatostatin-14 und dem längeren Somatostatin-28 (Brazeau et al., 1973; Pradayrol et al., 1980). Somatostatin-14 ist zwar der häufiger vorkommende Vertreter, allerdings ist Somatostatin-28 die in ihrer Funktion potentere Variante (siehe Abbildung 3) (Modlin et al., 2010). Für die natürlichen Somatostatinproteine besteht eine hohe Affinität zu allen Rezeptorsubtypen, allerdings binden die Rezeptoren sstr1 bis sstr4 Somatostatin-14 stärker, wohingegen sstr5 eine bis zu 15-fach höherer Affinität zu Somatostatin-28 aufweist (Patel & Srikant, 1997; Patel, 1999).



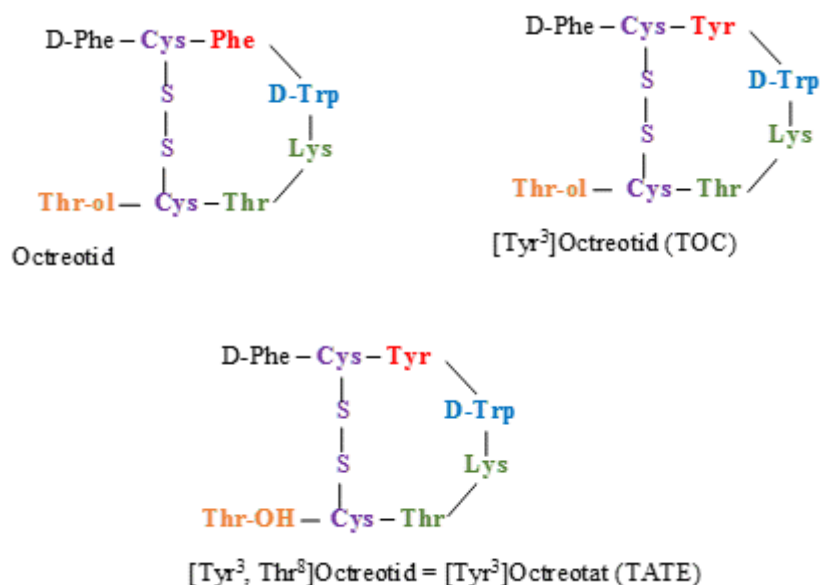
### Abbildung 3: Aufbau der nativen Somatostatinmoleküle Somatostatin-14 und Somatostatin-28

Über eine Disulfidbrücke, an der zwei Cysteinamiosäuren (lila) beteiligt sind, wird eine  $\beta$ -Schleife, aus den für die biologische Aktivität notwendigen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp), Lysin (Lys) und Threonin (Thr) (grün), gebildet (Modlin et al., 2010); Abbildung modifiziert nach Modlin et al., 2010

Hinsichtlich des antiproliferativen Effektes sowie der hemmenden Funktionen von Somatostatin wurden Analoga mit einer längeren biologischen Halbwertszeit und unterschiedlicher Rezeptorspezifität zu den sstr-Subtypen entwickelt, die eingesetzt werden, um das Tumorwachstum zu stoppen und die Symptomatik bei hormonaktiven NET zu lindern (Patel & Srikant, 1997; Modlin et al., 2010).

In der nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie werden u. a. die Somatostatinanaloga  $[\text{Tyr}^3]\text{Octreotid}$  (TOC) und  $[\text{Tyr}^3]\text{Octreotate}$  (TATE) eingesetzt, die über den Chelator DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure) an ein Radionuklid gekoppelt werden können (siehe Abbildung 4) (Forrer et al., 2007). Ziel ist es, über die Rezeptorspezifität für die in NET überexprimierten Somatostatinrezeptoren den radioaktiven Liganden gezielt an seinem Wirkungsort zu platzieren (Gotthardt et al., 2006). Auch die Somatostatinanaloga besitzen eine unterschiedlich hohe Bindungskraft zu den verschiedenen Rezeptorsubtypen. Die Rezeptorspezifität ist abhängig von den

eingesetzten Aminosäuren im Analogon, dem verwendeten Chelator und dem komplexierten Metall (Reubi et al., 2000; Maecke & Reubi, 2011). So führte der Austausch der Aminosäure Phenylalanin an der dritten Stelle von Octreotid mit Tyrosin dazu, dass die Affinität zu sstr2 gestiegen ist, allerdings wurde die Affinität zu sstr3 und sstr5 reduziert (siehe Abbildung 4) (Maecke & Reubi, 2011). Eine erhöhte Affinität zu sstr2 existiert auch, wenn eine größere Hydrophilität im Analogon besteht, wohingegen eine gesenkte Hydrophilität die Affinität zu sstr3 und sstr5 begünstigt. DOTATATE ist im Vergleich zu DOTATOC hydrophiler (siehe Abbildung 4) (Reubi et al., 2000; Maecke & Reubi, 2011). DOTATOC zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu sstr2 und eine etwas geringere Affinität zu sstr5 und sstr3 aus. Verglichen damit hat DOTATATE eine 6- bis 9-fach höhere Affinität zu sstr2, jedoch kaum bis keine Bindungskraft zu sstr5 und sstr3 (Reubi et al., 2000; Maecke & Reubi, 2011).



#### Abbildung 4: Struktureller Vergleich synthetischer Somatostatinanaloga

Die Aminosäuren der β-Schleife für die biologische Aktivität wurden mit kleineren Abwandlungen erhalten. Tryptophan (Trp) und Lysin (Lys) sind dabei essentiell. Das D-Tryptophan (D-Trp) soll die Wirkamkeitsdauer verlängern (Modlin et al., 2010). Der Austausch der lipophileren Aminosäure Phenylalanin (Phe) an der dritten Stelle vom Octreotid mit dem hydrophileren Tyrosin (Tyr) bei [Tyr³]Octreotid (TOC) und [Tyr³]Octreotat (TATE) erhöht die sstr2-Affinität (rot). Durch den Austausch des Threoninol (Thr-ol) durch Threonin (Thr-OH) bei TATE wurde die sstr2-Selektivität weiter erhöht (orange) (Reubi et al., 2000; Maecke & Reubi, 2011); Abbildung modifiziert nach Reubi et al., 2000; Maecke & Reubi, 2011; Jensen, 2012

## 2.3 Messverfahren der Nuklearmedizin

### 2.3.1 Detektion und Weiterverarbeitung von $\gamma$ -Strahlen

Ein Szintillationskristall besteht üblicherweise aus einem mit Thallium dotierten NaI-Kristall (Natriumjodidkristall) (Lange, 2002). Das dem NaI-Kristall zugesetzte Thallium bewirkt, dass dieser Photonen im sichtbaren Spektrum mit der charakteristischen Wellenlänge von 415 nm emittiert (Lange, 2002; Bailey et al., 2005). Die Aufgabe des angeschlossenen Photomultipliers (Sekundärelektronenvervielfacher) besteht darin, den Primärlichtimpuls, der beim Auftreffen eines Photons im Kristall entsteht, in einen Spannungsimpuls umzuwandeln (Lange, 2002). Beim Auftreffen des Lichtimpulses auf der Photokathode werden Sekundärelektronen erzeugt, die wiederum im Vakuum des angeschlossenen Glaskolbens frei auf hintereinander geschaltete sog. Dynoden treffen. Die Elektronen geben an jeder Dynode ihre kinetische Energie ab und setzen wieder neue Elektronen frei (Lange, 2002; Hermann, 2004a). Der Elektronenstrom wird somit verstärkt bis ein messbarer Impuls entstanden ist, der einen proportionalen Zusammenhang mit den aus der Photokathode herausgelösten Elektronen hat. Das wiederum lässt Rückschlüsse auf die absorbierte Energie der  $\gamma$ -Strahlung zu (Schicha & Schober, 2013a). Durch einen angeschlossenen Verstärker wird die Impulshöhe dem verwendeten Analysator angepasst, der wiederum die Aufgabe hat nur Impulse einer vorher bestimmten Höhe zur weiteren Verarbeitung zuzulassen (Lange, 2002; Hermann, 2004a). Die analogen Signale der Messgeräte werden mittels der Analysatoren für die Verarbeitung in EDV-Systemen digitalisiert und in Zahlen umgewandelt (Lange, 2002). Szintillationszähler dieser Art finden sich u.a. in  $\gamma$ -Countern, die zur Untersuchung von Organproben auf Anreicherung und Verteilung von Radionukliden mit  $\gamma$ -Anteil eingesetzt werden sowie in Detektorköpfen von  $\gamma$ -Kameras (Lange, 2002; Hermann, 2004a). In Ringscannern zur PET sind viele kleine Szintillationsdetektoren eingebaut, in denen jedoch statt NaI-Kristallen Wismutgermanat, Lutetiumoxyorthosilicat oder Gadoliniumoxyorthosilicat verwendet werden (Lange, 2002; Schicha & Schober, 2013a).

### 2.3.2 <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie

#### 2.3.2.1 Funktionelle Einheiten der Niere

Die funktionellen Einheiten der Niere sind die Nephrone (König et al., 2009). Ein Nephron setzt sich aus dem Nierenkörperchen (Corpusculum renis) und dem Tubulussystem, das weiter in den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife und den distalen Tubulus untergliedert wird, zusammen. Der distale Teil des Tubulussystems eines Nephrons mündet schließlich in das Sammelrohr, welches den Abfluss mehrerer Nephrone darstellt (König et al., 2009). Ein Glomerulum wird aus Kapillarschlingen gebildet und enthält zuführende und abführende Gefäße. Die Bowman-Kapsel, die das Glomerulum umgibt, besteht aus einem Außenblatt und einem Innenblatt, zwischen denen sich ein Spaltraum bildet, in den der Primärharn aufgenommen wird. Das Glomerulum und die beiden Blätter der Bowman-Kapsel werden als Nierenkörperchen bezeichnet, die gleichmäßig über die gesamte Nierenrinde verteilt sind. Der Primärharn entsteht durch Ultrafiltration in den Glomerula (König et al., 2009). Dies ist ein passiver Vorgang, bei dem die glomeruläre Filtrationsrate von den Eigenschaften der Filtermembran (Kapillaren, Porengröße) und den hydrostatischen und kolloidosmotischen Druckdifferenzen, aus denen sich der effektive Filtrationsdruck berechnet, abhängt (Silbernagl, 1996; Fromm & Gäbel, 2005). Das Ultrafiltrat wird in die proximalen Tubuli weitergeleitet. Im angeschlossenen Tubulussystem erfolgt über aktive Transportmechanismen zum einen eine tubuläre Rückresorption von für den Organismus wichtigen Substanzen in das Blut und zum anderen, über die tubuläre Sekretion, die Ausscheidung von weiteren Substanzen. Die Konzentrierung des Harns wird über das Gegenstromprinzip bewerkstelligt (Silbernagl, 1996; Fromm & Gäbel, 2005).

#### 2.3.2.2 Prinzip der <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie

Bei der <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie wird das Prinzip der planaren Szintigraphie mittels  $\gamma$ -Kameras angewendet, das eine zweidimensionale Darstellung der ausgesendeten  $\gamma$ -Strahlen ermöglicht. Über das Anlegen von Regions of Interest (ROI) kann eine Zeitaktivitätskurve über das Aufnahme- und Ausscheidungsverhalten der Niere generiert werden (Schlegel & Bille, 2002b).

$^{99m}\text{Tc}$  (Technetium ( $^{99m}\text{Tc}$ )) hat mit einer Halbwertszeit von 6,02 h und als reiner  $\gamma$ -Strahler, dessen Strahlungsenergie mit 141 keV im optimalen Energiebereich für Detektorköpfe von  $\gamma$ -Kameras liegt, nahezu ideale Eigenschaften für die nuklearmedizinische Bildgebung. Die Herstellung von  $^{99m}\text{Tc}$  erfolgt durch einen  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Mutter/Tochter- Nuklidgenerator (Schicha & Schober, 2013a). Die anschließende Markierung mit Mercaptoacetyltriglycin ( $\text{MAG}_3$ ) erfolgt über ein Kit-System (Lange, 2002). Das aus dem Generator gewonnene Eluat wird dem gebrauchsfertigen Pharmakon im Kit zugegeben (Hermann, 2004a). Über verschiedene chemische Vorgänge wird das Technetium mit dem  $\text{MAG}_3$  komplexiert. Eine Reinheit des entstandenen Radiopharmakons von mindestens 95 % ist Voraussetzung für dessen Einsatz (Bubek, 1993). Mit der dynamischen  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{MAG}_3$ -Nierenszintigraphie ist es möglich, die Nieren sowohl hinsichtlich ihrer Perfusion als auch im Hinblick auf ihre tubuläre Sekretion und Exkretion (tubuläre Clearance) zu untersuchen. Man spricht von einer kombinierten Perfusions- und Funktionsszintigraphie (Hermann, 2004b; Kobe, 2013). Neben einer schnellen Anreicherung in der Niere sollte ein ideales Radiopharmakon auch möglichst direkt in den Urin übergehen, bei einmaliger Nierenpassage nahezu vollständig ausgeschieden und nicht oder nur geringfügig in anderen Organen verstoffwechselt werden (Bubek, 1993; Hermann, 2004b).  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{MAG}_3$  wird v. a. tubulär sezerniert, da es zu etwa 90 % im Plasma an Proteine gebunden ist, sodass nahezu keine glomeruläre Filtration stattfindet. Das ermöglicht eine direkte Beurteilung der tubulären Extraktion (Bubek, 1993; Hermann, 2004b). Diese Art der Nierenszintigraphie wird bei verschiedenen Fragestellungen angewendet, so zum Beispiel zum Nachweis von Funktionsstörungen bedingt durch eine Nierenarterienstenose, zur Ursachenabklärung bei Harnstauungen, zur Kontrolle bei transplantierten Nieren, vor geplanten Nephrektomien zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der verbleibenden zweiten Niere oder auch im Falle einer Behandlung mit nephrotoxischen Therapeutika zur Beurteilung der Nierenfunktion im Vorfeld sowie zur Kontrolle im Behandlungsverlauf (Kobe, 2013).  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{MAG}_3$ -Nierenszintigraphien fanden auch in präklinischen Studien mit Mäusen zur Untersuchung von renalen Reperfusionsschäden nach einer künstlich herbeigeführten Ischämie oder bei unilateraler Obstruktion des Ureters sowie zur Evaluierung verschiedener Nephroprotektiva zum kombinatorischen Einsatz mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATE Anwendung (Roberts et al., 2007; Tantawy et al., 2012; Ilhan, 2013).



### 2.3.3 PET-Messung mit rezeptorspezifischen $^{68}\text{Ga}$ -Tracern

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können zwei- oder dreidimensionale Bilder erzeugt werden, indem sich die Vernichtungsstrahlung, die beim  $\beta^+$ -Zerfall entsteht, zu Nutze gemacht wird. Die beiden im  $180^\circ$ -Winkel auseinanderstrebenden 511 keV  $\gamma$ -Quanten werden koinzidiert detektiert, wodurch ein direkter Zusammenhang zwischen Entstehungsort der Strahlung und des Auftreffortes im PET-Detektorsystem entsteht. Bei einem PET-Ringscanner umgibt den Patienten bzw. das Versuchstier ein Ringsystem mit einer Vielzahl an Szintillationskristallen. Die aufgenommenen Daten werden mit speziellen Computerprogrammen rekonstruiert, sodass auswertbare und beurteilbare Bilder entstehen (Lange, 2002; Schlegel & Bille, 2002b). Im Falle von NEN dienen  $^{68}\text{Ga}$ -PET/CT-Scans zur Detektion und Lokalisation von Primärtumoren und deren eventuellen Metastasen sowie zur Evaluierung des therapeutischen Einsatzes von Somatostatinanaloga und für prognostische Aussagen (Haug et al., 2010; Virgolini et al., 2010).  $^{68}\text{Ga}$  wird mittels eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Mutter-Tochter-Nuklidgenerators gewonnen und zeichnet sich durch einen  $\beta^+$ -Zerfall mit einer Zerfallsenergie von 830 keV und besagter Vernichtungsstrahlung aus. Seine Halbwertszeit beträgt 67,7 min. (Fani et al., 2008; Schicha & Schober, 2013a).  $^{68}\text{Ga}$  wird in Kombination mit DOTATOC, DOTATATE oder auch DOTANOC, einem Somatostatinanalogon, das neben dem sstr2 auch sstr3 und sstr5 bindet, eingesetzt (Haug et al., 2010; Virgolini et al., 2010; Poeppel et al., 2011). Die Diagnostik über PET-Scans mittels  $^{68}\text{Ga}$ -gekoppelten Somatostatinanaloga erweist sich gegenüber der  $^{111}\text{In}$ -Octreotid-Szintigraphie aufgrund einer höheren und rezeptorspezifischeren Affinität der eingesetzten Somatostatinanaloga, einer höheren Bildqualität bei einer geringeren Strahlenbelastung für die Patienten als überlegen (Gotthard et al., 2006; Gabriel et al., 2007; Virgolini et al., 2010; Maas & Forrer, 2011). Ein Vergleich zwischen  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC- und  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE-PET/CT-Scans zeigte eine vergleichbare Leistung der beiden hinsichtlich der Detektion von Läsionen, wobei  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC hierbei, vermutlich durch die zusätzliche Bindungskapazität zu sstr5, etwas besser abschnitt (Poeppel et al., 2011).

## 2.4 Endoradiotherapie neuroendokriner Neoplasien

### 2.4.1 Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie

Einsatz findet die Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) bei nicht operablen und bereits metastasierten GEP-NET und bei Karzinoidtumoren anderer Lokalisationen wie den bronchialen TC und AC (Kwekkeboom et al., 2005; Mariniello et al., 2016). Eine Voraussetzung für die Anwendung von radionuklid-komplexierten Somatostatinanaloga ist die Anwesenheit von sstr auf der Oberfläche des Primärtumors und der Metastasen sowie der Ausschluss diverser Kontraindikationen seitens des Patienten (Gotthardt et al., 2006; Forrer et al., 2007, Kwekkeboom et al., 2009; Rinke & Arnold, 2014). Die häufigste Anwendung finden heutzutage die  $\beta$ -Strahler  $^{90}\text{Yttrium}$  ( $^{90}\text{Y}$ ) und  $^{177}\text{Lutetium}$  ( $^{177}\text{Lu}$ ), die über den Chelator DOTA an die Somatostatinanaloga TATE oder TOC gekoppelt werden (Gotthardt et al., 2006; Rinke & Arnold, 2014). DOTA ist in der Lage,  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$  sicher zu binden und verhindert somit, dass sich freie Radionuklide vermehrt im Knochenmark anreichern (Forrer et al., 2007). Das schließlich an den sstr gebundene Radiopharmakon wird über selbigen Rezeptor in die Zelle eingeschleust und über Lysosomen abgebaut. Dadurch reichert sich der radioaktive Metabolit vermehrt in der Zelle an und es wird eine Tumorschädigung durch die intrazelluläre Bestrahlung herbeigeführt (Duncan et al., 1997; Waser et al., 2009; Schicha & Schober, 2013b).

$^{177}\text{Lu}$  ist ein niederenergetischer  $\beta$ -Emitter mit maximal 497 keV und durchschnittlich 149 keV. Die Strahlung hat zudem  $\gamma$ -Anteile mit 208 keV und 113 keV. Die Eindringtiefe ins Gewebe beträgt bis zu 2,5 mm (durchschnittlich 0,7 mm). Seine Halbwertszeit beträgt 6,71 Tage (Schicha & Schober, 2013a; Poeppel et al., 2015). Bei der Herstellung des  $^{177}\text{Lu}$  mittels indirekter Kernreaktion entsteht durch die Bestrahlung von  $^{176}\text{Ytterbium}$  ( $^{176}\text{Yb}$ ) das kurzlebige  $^{177}\text{Yb}$ , das dann ausschließlich zu  $^{177}\text{Lu}$  zerfällt. Somit kann eine sehr hohe Nuklidreinheit erreicht werden (Hashimoto et al., 2003).

Die PRRT wird als Behandlungsmöglichkeit von metastasierten und inoperablen GEP-NET angesehen, die bei der langsam wachsenden Tumorform größere Therapieerfolge aufzuweisen scheint als es die Chemotherapie vermag (Kwekkeboom et al., 2010). Es wird von einer symptomatischen Verbesserung bei den zur Therapie eingesetzten Radionuklid-Somatostatinanaloga berichtet,

darunter, neben  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, auch [ $^{111}\text{In}$ -DTPA $^0$ ]Octreotid (Kwekkeboom et al., 2010).  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE wirken sich positiv auf die Tumorregression aus. Ein Ansprechen auf die erfolgte Therapie über einen Zeitraum von mehr als 30 Monaten konnte verzeichnet werden (Kwekkeboom et al., 2008; Kwekkeboom et al., 2010). Bei der Verwendung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE ist von einer signifikanten Steigerung der Lebensqualität bei allen Patienten sowie von einer Zunahme der Überlebenszeit die Rede (Kwekkeboom et al., 2010). Zudem gilt die PRRT als relativ nebenwirkungsarme Therapieform, sofern zusätzlich Nierenprotektiva verabreicht werden (Kwekkeboom et al., 2005). Sind häufigere Wiederholungen eine Behandlung notwendig, kann zur Reduktion der toxischen Nebenwirkungen bei einer initial erfolgten Anwendung von  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC auf  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE umgestiegen werden (Frilling et al., 2006). Der Einsatz von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in einem früheren Stadium scheint empfehlenswert (Kwekkeboom et al., 2010). Im direkten Vergleich von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE scheint  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in Hinblick auf die Verweildauer im Tumor die überlegenere Alternative zu sein.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zeigt dagegen ein günstigeres Verhalten für Nieren und Milz (Esser et al., 2006).

Bei bronchopulmonalen Karzinoidtumoren stellt sich der monotherapeutische Einsatz mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in einem frühen Stadium der Erkrankung als am besten geeignet dar, um eine Verzögerung der Progression und eine Steigerung der Überlebenszeit zu erwirken (Mariniello et al., 2016). In einer Studie zum therapeutischen Einsatz von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE bei Patienten mit einer ED des SCLC konnten nur enttäuschende Ergebnisse generiert werden. Allerdings wurde von darauf hingewiesen, dass der Einsatz in einem früheren Stadium der Erkrankung mit fraktionierten Dosen in entsprechender Höhe oder auch in Kombination mit Chemotherapie erfolgsversprechender sein könnte (Sollini et al., 2013). Dabei wird auf eine präklinische Therapiestudie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE an Mäusen mit subkutanen SCLC-Tumoren Bezug genommen, in der die PRRT als alternative Behandlungsmöglichkeit beurteilt, sofern sie in optimierter Form und in fraktionierten Dosen eingesetzt wird (Erlandsson et al., 2011). In einer anderen Studie, bei der eine Chemotherapie in Kombination mit PRRT präklinisch erfolgsversprechend war, wurde dies auf einen klinischen Fall übertragen, bei dem ein temporäres Ansprechen verzeichnet werden konnte (Lewin et al., 2015).

Für eine Optimierung des Behandlungsregimes werden Empfehlungen dahingehend ausgesprochen, von den in der Praxis häufig angewendeten standardisierten Behandlungsschemata abzukommen und stattdessen einen Therapieplan einzusetzen, der auf einer individuellen Dosimetrie beruht (Kwekkeboom et al., 2008; Kam et al., 2012; Bison et al., 2014; Rinke & Arnold, 2014).

#### **2.4.2 Toxizität und limitierende Faktoren**

Die PRRT gilt generell als relativ sichere Therapieform mit nur moderaten Nebenwirkungen, sofern gewisse Aspekte berücksichtigt werden. So sind vor einer PRRT bestimmte Laborparameter und eventuelle Ausschlusskriterien zu erheben. Richtlinien dazu bietet die ENETS (Forrer et al., 2007; Kwekkeboom et al., 2009). Während eine Lebertoxizität tendenziell eher selten und in milder, meist reversibler Form auftritt, stellt sich eine hämatologische Toxizität häufiger ein, die aber auch zumeist nur in milder Form und transient auftritt. Sie wird durch die Anreicherung von Aktivität im Knochenmark ausgelöst (Forrer et al., 2007). Besonderes Augenmerk muss allerdings auf die Niere und ihre Funktionsfähigkeit gerichtet werden, da die Nierentoxizität den wichtigsten limitierenden Faktor bei der PRRT darstellt (Forrer et al., 2007). Die maximal tolerierte Dosis der verabreichten Aktivität definiert sich durch die kritischen Organe Niere und Knochenmark (Forrer et al., 2007). Als allgemein tolerierte Nierendosis wird ein Grenzwert, ausgehend von der externen Strahlentherapie, von 23 Gy angegeben (Gotthardt, 2010). Für die kritische Nierendosis in der internen Radiotherapie haben sich höhere Grenzwerte von 30–37 Gy herausgestellt (Konijnenberg, 2003; Barone et al., 2005). Da sich die interne Radiotherapie von der externen Strahlentherapie durch eine heterogene Verteilung des Radionuklids, die unterschiedlichen Reichweite diverser Radionuklide, Unterschiede in Dosisleistungen und absorbierten Dosisraten sowie der fraktionierten Applikation, durch die zwischenzeitlich Reparaturmechanismen in der Niere einsetzen können, unterscheidet, empfiehlt sich ein individuelles Dosisberechnungsmodell über die biologisch effektive Dosis (BED) (Barone et al., 2005; Gotthardt, 2010). Bei  $^{177}\text{Lu}$  ist, im Gegensatz zu  $^{90}\text{Y}$ , ein moderater Nierenschaden nicht zwingend ein Ausschlusskriterium für die Behandlung (Zaknun et al., 2013). Vor einer PRRT sollten immer die Nierenparameter Harnstoff und Kreatinin bzw. die Kreatininclearance bestimmt werden. Bei einem

bereits bekannten Nierenschaden oder bei Vorliegen von Risikofaktoren sollten zusätzlich weiterführende Untersuchungen eingeleitet werden (Forrer et al., 2007; Zaknun et al., 2013). Die Niere ist das am meisten gefährdete Organ, da der Großteil des Radiopharmakons eine renale Ausscheidung erfährt (Forrer et al., 2007). Die kleinen Radiopeptidmoleküle werden zunächst glomerulär filtriert und, obwohl ein Großteil anschließend über den Urin ausgeschieden wird, erfolgt im proximalen Tubulus eine teilweise Rückresorption des radioaktiven Somatostatinanalogons (Rolleman et al., 2010). Die eingesetzten Somatostatinanaloga werden in die Tubuluszelle aufgenommen und in den Lysosomen nahe des Nukleus abgelagert (Duncan et al., 1997; Rolleman et al., 2010). Diese teilweise Reabsorption und der Verbleib der radioaktiven Substanz im proximalen Tubulus können zu einer schädigenden Strahlendosis führen (Forrer et al., 2007; Rolleman et al., 2010). Die größte Anreicherung scheint dabei in der Nierenrinde stattzufinden (De Jong et al., 2004). Ein entstehender Funktionsverlust der Niere ist ein kontinuierlicher über Jahre andauernder Prozess, der sich in einer Abnahme der Kreatininclearance äußert (Valkema et al., 2005). Für die Reabsorption der Somatostatinanaloga werden der multiple Liganden bindende Rezeptor Megalin sowie eventuell auch ein zweiter Rezeptormechanismus, über das Cubilin, verantwortlich gemacht (De Jong et al., 2005; Gotthardt et al., 2007). Auch die in der Niere exprimierten Somatostatinrezeptoren tragen zu der Aufnahme von Aktivität in die Nierenzellen bei (Rolleman et al., 2007b; Vegt et al., 2010). Um die Reabsorption der radioaktiv geladenen Somatostatinanaloga zu reduzieren, müssen die vorliegenden Transportmechanismen blockiert werden (Rolleman et al., 2010). Dafür können erfolgreich positiv geladene Aminosäuren wie Arginin und Lysin sowie der Gelatineplasmaexpander Gelofusine eingesetzt werden (Rolleman et al., 2003; Rolleman et al., 2008). Für die Anwendung verschiedener Aminosäuren zur Nephroprotektion existieren unterschiedliche Protokolle (Zaknun et al., 2013). Zusätzlichen Schutz kann der phosphorylierte Aminoalkohol Amifostine durch das Abfangen oxidativer Strahlenschädigung bieten, der nicht nur nephroprotektiv wirkt, sondern auch die schädliche Strahlenwirkung auf das Knochenmark verringern kann (Rolleman et al., 2007a).

### **3. Tumorbilogie und der Einsatz von iRGD**

#### **3.1 Tumorentstehung und Tumorwachstum**

Vermutlich sind die meisten Tumoren klonalen Ursprungs und somit auf eine einzelne Tumorstammzelle zurückzuführen (Kusewitt & Rush, 2009). Am Anfang dieses Prozesses steht laut Kusewitt & Rush (2009) die Initiation, bei der durch Karzinogene die DNA geschädigt wird und sich Mutationen manifestieren. Danach folgt die Promotion, bei der es zur Zellproliferation kommt. Hierbei sind die anregenden Reize, sog. Tumorpromotoren, selbst nicht mutagen, sondern verschaffen den initiierten Zellen einen Wachstumsvorteil. Bei der darauf folgenden Progression wird der Tumor mit wachsender Heterogenität der Tumorzellen und steigendem Metastasierungspotential stetig maligner. Während dieses Prozesses geschehen Veränderungen sowohl in der Tumorzelle als auch in deren diese umgebenden Milieus, die diese Entwicklung fördern (Kusewitt & Rush, 2009).

Das unkontrollierte Wachstum der Tumoren ist auf die genetischen Veränderungen der regulatorisch wirkenden Systeme zurückzuführen (Kusewitt & Rush, 2009). So haben Onkogene normalerweise eine koordinierende Funktion hinsichtlich der Proliferation, Mobilität und Differenzierung von Zellen (Moch et al., 2012). Erfolgt eine Mutation in den Protoonkogenen, so werden die Onkoproteine u. a. vermehrt oder als konstitutiv aktive Proteine exprimiert. Letztere sind Proteine, die eine autonome und kontinuierliche biologische Aktivität aufweisen (Moch et al., 2012). Neben den Onkogenen sind auch die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen sehr wichtige funktionelle Regulatoren. Ein gänzlich Fehlen oder die Expression eines inaktiven Proteins dieser supprimierenden Faktoren ermöglicht den Tumorzellen ein ungehindertes Wachstum (Kusewitt & Rush, 2009; Moch et al., 2012). Des Weiteren besitzen neoplastische Zellen eine Apoptoseresistenz, die auf Mutationen an Genen der apoptoseregulierenden Signalkaskade zurückzuführen sind. Das unbegrenzte Replikationsvermögen, das Tumorzellen aufweisen, wird durch die Aktivierung der Telomerase ermöglicht und verhindert die Zellalterung (Moch et al., 2012).

### 3.2 Tumorstroma, Angiogenese und Metastasierung

Das Tumorstroma wird gebildet von der extrazellulären Matrix und den sich darin befindlichen Fibroblasten sowie verschiedener Entzündungs-, Immun- und Endothelzellen (Moch et al., 2012). Zwischen den eigentlichen Tumorzellen und dem Stroma gehen komplexe Interaktionsvorgänge von statten, die u.a. über den Austausch von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen und Entzündungsmediatoren Auswirkungen auf Wachstum, Differenzierungsgrad und Verhalten der Tumor- und Stromazellen haben (Kusewitt & Rush, 2009).

Tumorzellen siedeln sich bevorzugt in der Nähe von Blutgefäßen an, da sie auf eine zuverlässige Versorgung mit Sauerstoff angewiesen sind (Weinberg, 2007a). Die einzelnen Tumorzellen werden hierbei über Diffusion mit frischem Sauerstoff versorgt. Dieser Vorgang kann aber nur über eine Strecke von 0,2 mm sichergestellt werden. Zellen, die weiter entfernt sind, leiden unter ernsthafter Hypoxie und stellen ihr Wachstum ein oder sterben ab (Weinberg, 2007a). Ein kontinuierlich wachsender, solider Tumor muss ab einem Durchmesser von 1 bis 2 mm für eine adäquate Sauerstoff- und Nährstoffversorgung auf eine eigene Blutversorgung umstellen (Kusewitt & Rush, 2009). Dieser als „angiogenic switch“ bezeichnete Vorgang hat als einen wichtigen auslösenden Faktor die Detektion einer Hypoxie im Tumor. Bei Hypoxie wird HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible transcription factor 1), ein sauerstoffsensitiver Transkriptionsfaktor, gebildet, der wiederum die Expression von angiogenesestimulierenden Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) oder TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) hervor ruft (Weinberg, 2007a; Weinberg, 2007b). Zunächst werden Endothelzellen bereits existierender Blutgefäße rekrutiert und anschließend angeregt zu proliferieren. Danach stellt sich eine gerichtete Wanderung der Endothelzellen durch die extrazelluläre Matrix ein und schließlich erfolgt deren Reifung und Differenzierung (Kusewitt & Rush, 2009). Die Endothelzellen der Blutgefäße produzieren Wachstumsfaktoren, die proliferativ auf die Tumorzellen wirken (Kusewitt & Rush, 2009). Die entstandenen Tumorgefäße sind in der Regel stärker gewunden, weisen ein weiteres Lumen und eine größere Permeabilität auf als physiologische Blutgefäße (Yuan et al., 1995; Kusewitt & Rush, 2009). Die erhöhte Permeabilität entsteht zum einen durch die unregulierte Produktion von VEGF im Tumor und zum anderen weil sich die Plasmamembranen von benachbarten Endothelzellen nicht

berühren (Weinberg, 2007b). Das hat Vorteile für den Tumor, weil ihm durch perivaskuläre Ablagerungen von Fibrin und den direkten Kontakt des Blutplasmas mit den angrenzenden Zellen die Ausbreitung erleichtert wird (Kusewitt & Rush, 2009). Diese Eigenschaft der Blutgefäße wird auch für den Einsatz von Therapeutika genutzt (Matsumura & Maeda, 1986; Torchilin, 2011). Bei diesem sog. „enhanced permeability and retention effect“ (EPR-Effekt) reichern sich makromolekulare Therapeutika vermehrt im Tumorgewebe an, die dort auch eine verlängerte Verweildauer haben (Maeda et al., 2003).

Für die Metastasierung ist die Anbindung an das Gefäßsystem essentiell (Kusewitt & Rush, 2009). Vor der eigentlichen Metastasierung muss zunächst die sog. Invasion in die extrazelluläre Matrix erfolgen. Zunächst werden Zell-zu-Zell-Kontakte einzelner Zellen aufgelöst, sodass diese sich vom Primärtumor abspalten können. Wichtige Adhäsionsstrukturen diesbezüglich stellen die Cadherine (E-Cadherine) dar (Kusewitt & Rush, 2009; Moch et al., 2012). In der sog. Epithel-Mesenchym-Transition werden bisher epitheliale Eigenschaften in mesenchymale umgewandelt (Weinberg, 2007a). Natürliche Barrieren wie Basalmembranen werden durchbrochen, indem diverse degradierende Proteasen, v. a. Matrix-Metalloproteinasen, im Umfeld der Tumorzellen aktiver werden (Kusewitt & Rush, 2009; Moch et al., 2012). Den Tumorzellen ist es anschließend durch die aktive Lokomotion möglich sich in das zu invadierende Gewebe hineinzubewegen (Moch et al., 2012). Die Kontaktaufnahme der Tumorzellen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie z. B. Fibronectin, Laminin, Kollagen oder Vitronectin, erfolgt hierbei über Integrine und andere Rezeptoren wie Hyaluronsäurerezeptoren, die während der Invasion und Metastasierung vermehrt und auf der gesamten Oberfläche der Tumorzellen ausgeprägt sind (Kusewitt & Rush, 2009; Moch et al., 2012). Das Aktinfilamentsystem der Tumorzellen ermöglicht anschließend die aktive amöboide Fortbewegung (Moch et al., 2012). Im weiteren Verlauf der Metastasierung findet die Intravasation, das Eindringen in Blut- und Lymphgefäße bzw. Körperhöhlen, statt. Die Tumorzellen werden über Blut- und Lymphgefäße verschleppt. Als letzter Schritt erfolgt die Extravasation der Tumorzellen, der Austritt aus den Metastasierungswegen (Moch et al., 2012).



### 3.3 Integrine, Neuropillin-1 und iRGD

Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, bei denen aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten 24 bekannte Heterodimervarianten gebildet werden können (Weinberg, 2007c). Jede  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit hat eine große extrazelluläre Domäne, eine transmembranöse Domäne sowie einen kleinen zytoplasmatischen Teil (siehe Abbildung 5) (Hynes, 2002; Weinberg, 2007c). Die Integrine verschaffen den Zellen die Fähigkeit, aktiv zu erkennen, ob sie mit der extrazellulären Matrix verbunden sind und stabilisieren das Gewebe (Weinberg, 2007c). Zudem vermögen die Integrine, neben der Bindung ihrer Liganden in der extrazellulären Matrix, auch sog. „focal adhesions“ zu bilden, bei denen sie mit ihren Bindungsstellen im Zytoplasma auch dort an Bestandteile wie u. a.  $\alpha$ -Aktinin, Vinkulin, Talin und Paxillin binden können (siehe Abbildung 5) (Hood & Cheresch, 2002; Weinberg, 2007c). Integrinen ist es nicht nur möglich Informationen von außerhalb in die Zelle zu leiten, sondern auch umgekehrt (Hynes, 1992, Hood & Cheresch, 2002). Über Integrine werden diverse Signale weitergeleitet, die Einfluss auf die Migration, Proliferation und das Überleben der Zelle haben (Hynes, 1992; Hood & Cheresch, 2002; Hynes, 2002).

Während der tumorinduzierten Angiogenese und der Metastasierung nehmen Integrine bei der aktiven Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung eine bedeutende und vielfältige Rezeptorstellung ein (Giancotti & Mainiero, 1994; Clezardin, 1998; Hood & Cheresch, 2002). Von besonderem Interesse sind hierbei das  $\alpha\beta3$ - und das  $\alpha\beta5$ -Integrin (Friedlander et al., 1995; Ruoslahti, 2002). Bei der Neoangiogenese werden diese Rezeptoren, v. a.  $\alpha\beta3$ , in ausgeprägter Form auf den Endothelzellen ausgebildet (Strömblad & Cheresch, 1996; Eliceiri & Cheresch, 1998). Sie finden sich jedoch nicht nur durch die intensivierte Angiogenese vermehrt in neoplastischem Gewebe, sondern bei diversen Neoplasien wie Melanomen, Glioblastomen, Lungenkarzinomen und auch bei Magenkrebs exprimieren die Tumorzellen selbst diese Integrine als Oberflächenrezeptoren aus (Majda et al., 1994; Marshall & Hart, 1996; Schnell et al., 2008; Böger et al., 2015). Zudem scheint v. a. eine ausgeprägte Expression der  $\alpha\beta3$ -Integrine einen Einfluss auf das maligne Verhalten und das Metastasierungspotential der Tumoren zu haben (Nip et al., 1992; Marshall & Hart, 1996; Liapis et al., 1997). Sehr ausführlich studiert wurde diesbezüglich das maligne Melanom. Es wurde erkannt, dass die Anwesenheit von  $\alpha\beta3$  den Zellen

das Überleben sichert (Petitclerc et al., 1999). Aufgrund der Erkenntnis, dass die  $\alpha v \beta 3$ -Integrine nur auf malignen Ausprägungen der Melanozyten exprimiert werden, scheint es hier einen Kriterium für Malignität zu sein (Felding-Habermann et al., 1992; Natali et al., 1997).

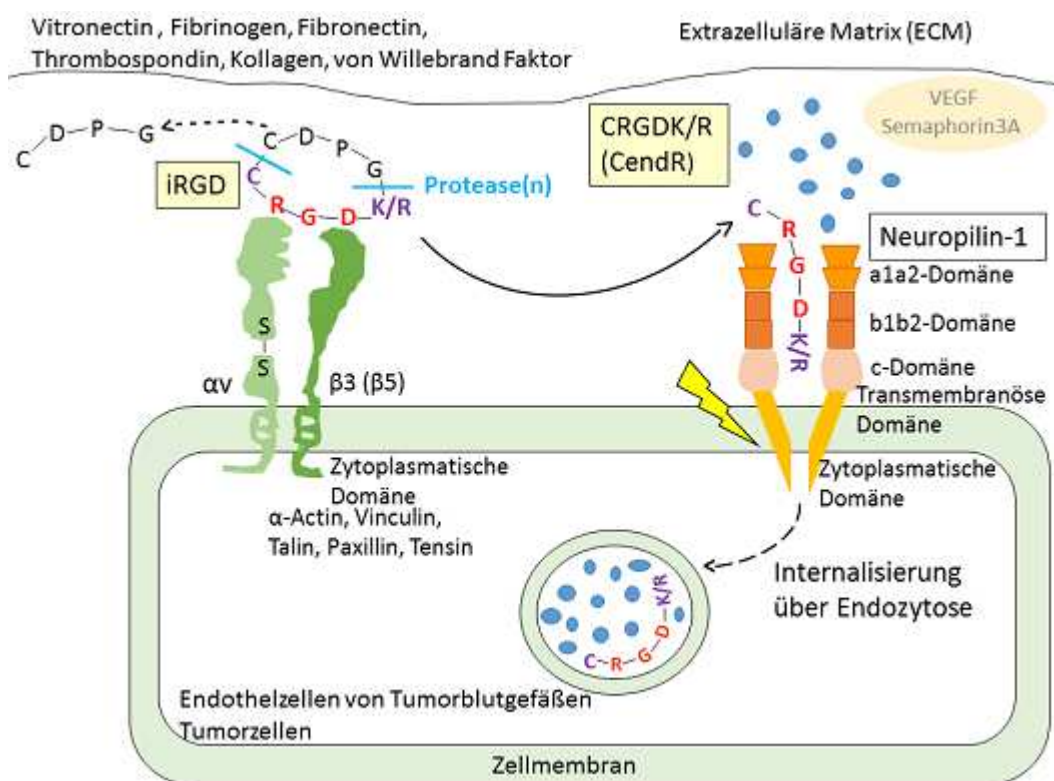
Aufgrund der großen Bedeutung im Rahmen der Tumorgenese stellen die  $\alpha v \beta 3$ -Integrine und auch die  $\alpha v \beta 5$ -Integrine einen potentiellen Angriffspunkt für neue anti-angiogenetische und anti-metastatische Therapeutika in der Krebstherapie dar (Brooks et al., 1994a; Eliceiri & Cheresch, 2001; Jin & Varner, 2004). Seit geraumer Zeit ist die Integrin-Erkennungssequenz, aus den drei bedeutenden Aminosäuren, Arginin-Glycin-Asparagin, die sog. RGD-Sequenz, bekannt (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987; Ruoslahti, 2003). Durch den Einsatz linearer oder zyklischer Peptide, die die RGD-Erkennungssequenz beinhalten, konnte in präklinischen Studien die tumorinduzierte Angiogenese und damit das Tumorstadium erfolgreich unterbunden werden (Brooks et al., 1994b; Brooks et al., 1995; Taga et al., 2002). Auch die Metastasierung ließ sich in präklinischen Studien durch die Anwendung solcher Integrin-Antagonisten erfolgreich verhindern (Komazawa et al., 1993; Buerkle et al., 2002; Sugahara et al., 2015). Für die Behandlung von Glioblastomen ist bereits ein vielversprechendes Medikament in der klinischen Erprobungsphase weit vorangeschritten, das auch bei Neoplasien anderer Genese klinisch getestet wird (Reardon & Cheresch, 2011; Ganguly et al., 2013). Weiteres Augenmerk wird auf den Einsatz  $\alpha v \beta 3$ -selektiver RGD-Peptide bei der bildgebenden Diagnostik gerichtet. Damit sollen, neoplastische Strukturen und angiogenetische Prozesse über den Nachweis von Integrinrezeptoren dargestellt werden (Beer & Schwaiger, 2008). Für die nuklearmedizinische Diagnostik werden verschiedenste RGD-Radiotracer auf ihren eventuellen klinischen Einsatz hin untersucht (Haubner et al., 2010; Beer et al., 2011; Gaertner et al., 2012; Haubner et al., 2014). Einige Radiotracer haben bereits am Patienten Einsatz gefunden, wie z.B.  $^{18}\text{F}$ -Galcato-RGD oder das  $^{18}\text{F}$ -AH11585 (Kenny et al., 2008; Beer et al., 2011; Haubner et al., 2014). Auch zwei  $^{68}\text{Ga}$ -gekoppelte RGD-Varianten sollen in der klinischen Phase getestet werden (Haubner et al., 2014).

Mit der Entdeckung des zyklischen iRGD-Peptids (internalizing RGD, tumor-homing peptide) eröffnete sich die Möglichkeit Therapeutika, die sonst nur über den EPR-Effekt an den Tumor gelangten, gezielt über die Zellwandbarriere in die Zelle einzuschleusen (Sugahara et al., 2009). Das iRGD-Peptid CRGDK/RGPDC enthält jene Erkennungssequenz CRGDK/R, oder allgemein ausgedrückt K/RXXX/R, die über den Neuropilin-1-Rezeptor (NRP-1) das Eindringen in den Tumor ermöglicht (Teesalu et al., 2009). R und K sind alternative Varianten, von denen die K-Variante die Internalisierung stärker betreibt (Teesalu et al., 2013). Die Sequenz hat eine gemeinsame Struktur mit den C-terminalen Enden der eigentlichen Liganden der NRP-1, dem VEGF-A165 und einigen Semaphorinen (Teesalu et al., 2009). Mittlerweile ist auch bekannt, dass über Neuropilin-2 mit einem anderen Peptid, das eine solche Erkennungssequenz enthält, ebenfalls eine Internalisierung erfolgen kann (Roth et al., 2012).

Die beiden Neuropilin-Rezeptoren sind transmembranöse Glykoproteine, die große Bedeutung für die Entwicklung des Nervensystems haben, sind aber auch auf diversen anderen Zellen des Organismus, u. a. auf neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes, Osteoblasten, Dendritischen Zellen, T-Zellen und Zellen des Glomerulums zu finden (Ellis, 2006). NRP-1 wird auf den Endothelzellen von arteriellen Gefäßen exprimiert, wohingegen NRP-2 auf Lymphgefäßen und Venen ausgebildet wird (Staton et al., 2007). NRP-1 und NRP-2 fördern durch die Verbindung mit VEGF die Angiogenese. Einen hemmenden Einfluss hat dagegen die Kombination mit Semaphorin (Ellis, 2006). NRP-1 und NRP-2 zeigen eine Überexpression auf Endothelzellen bei der tumorinduzierten Angiogenese und auf verschiedenen Tumorzellen (Ellis, 2006; Staton et al., 2007; Jubb et al., 2012).

Von NRP-1 ist bekannt, dass es mit VEGF über dessen C-terminales Ende interagiert und eine Permeabilität der Zellmembran bewirkt (Becker et al., 2005). Damit nun die Erkennungssequenz CRGDK/R ihre Wirkung an den Neuropilin-Rezeptoren entfalten kann, muss sie als C-terminales Ende zur Verfügung stehen, was auch als „C-end rule“ oder CendR bezeichnet wird (Sugahara et al., 2009; Teesalu et al., 2009). Die Aktivierung stellt einen mehrstufigen Prozess dar. Zunächst bindet das zyklische iRGD mit seiner RGD-Sequenz an das  $\alpha\beta 3$ -Integrin. Dort wird es proteolytisch gespalten und das zurückbleibende CRGDK/R bindet, nachdem es seine Bindungskraft zum Integrinrezeptor verloren hat, anschließend mit hoher Affinität an NRP-1, über welches nun die Internalisierung

erfolgt (siehe Abbildung 5) (Sugahara et al., 2009). Bisher ist bekannt, dass VEGF und Semaphorin 3A über unterschiedliche Signalwege eine Permeabilität der Gefäße bewirken (Dovrak & Feng, 2001; Acevedo et al., 2008). Bei VEGF erfolgt dies durch die Formung von sog. Vesiculo-Vacuolar-Organellen, einem Vesikelnetzwerk, das die Zellmembran durchtunnelt (Dovrak & Feng, 2001). Die genauen Prozesse der Internalisierung über NRP-1 sind noch nicht gänzlich geklärt und bedürfen noch ausgiebiger Erforschung (Tessalu et al., 2013). Die über den CendR-Signalweg eingeschleusten Substanzen scheinen im Zellinneren in Vesikel verpackt zu werden, was die Vermutung nahe legt, dass die Internalisierung über einen endozytotischen Vorgang abläuft. Die hohe Geschwindigkeit, mit der das geschieht, weist darauf hin, dass dies einen energieabhängigen, aktiven Prozess darstellt (siehe Abbildung 5) (Tessalu et al., 2013).



**Abbildung 5: Schritte des iRGD-vermittelten Internalisierungsprozesses mit der vermuteten energieabhängigen Endozytose**

Ergänzend hinzugefügt sind außerdem Liganden der Integrine ( $\alpha_v\beta_3$  alle aufgelisteten Liganden,  $\alpha_v\beta_5$  nur Vitronectin) in der extrazellulären Matrix und die Verbindungsproteine für die  $\beta$ -Untereinheit zum Aktin-Zytoskelett im Zellinneren, sowie der Aufbau des Neuropilin-1 nach Hynes, 1992; Ellis, 2006, Staton et al., 2007 und Weinberg, 2007c. Abbildungsteil Internalisierungsprozess modifiziert nach Sugahara et al., 2009 und Tessalu et al., 2009 mit Abbildungsteil energieabhängige Endozytose nach Teesalu et al., 2013

In der Tumorthherapie wird iRGD für seinen Einsatz sowohl als ein an die entsprechende Substanz gekoppeltes Peptid erforscht als auch als koadministriertes Peptid. Studien, bei denen iRGD in Kombination mit Zytostatika verabreicht wurden, haben eine signifikant erhöhte Anreicherung im Tumorgewebe ergeben (Sugahara et al., 2010; Akashi et al. 2014). Außerdem wird an der Entwicklung und Optimierung weiterer Peptide, die die CendR-Sequenz enthalten, geforscht (Roth et al., 2012; Alberici et al., 2013). Erste Untersuchungsergebnisse zu Peptiden, die durch NRP-1 nicht nur in die Zelle eindringen können, sondern auch zur Extravasation fähig sind, wurden kürzlich von Kadonosono und Mitarbeitern (2015) veröffentlicht.

#### **4. Arbeitshypothese**

Der Einsatz von radionuklidbeladenen Somatostatinanaloga zur Therapie verschiedener NEN verspricht eine hoffnungsvolle Behandlungsalternative. Jedoch bestehen auch bei dieser Therapieform dosislimitierende Faktoren. Ein Ziel ist es daher, stets die pathologischen Veränderungen so spezifisch wie möglich anzugreifen und gleichzeitig die gesunden Zellen bzw. Organe bestmöglich zu schonen.

Im Rahmen dieser Dissertation soll erforscht werden, ob durch den kombinatorischen Einsatz von iRGD mit [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) eine verbesserte Anreicherung im neoplastischen Gewebe und damit eine effizientere therapeutische Wirkung erzielt werden kann. Die hierzu angesetzten, sehr umfangreichen Therapiestudien an tumortragenden immundefizienten Nacktmäusen sind nach den gegebenen Möglichkeiten kliniknah gestaltet. Den eigentlichen Therapieversuchen vorangestellt sind nuklearmedizinische Biodistributionsstudien zur Evaluierung der Anreicherung von Aktivität in Nieren und Tumoren der verfügbaren Zelllinien sowie einer dosimetrischen Berechnung. Die Therapieversuche sind sowohl mit nur einem als auch mit zwei Therapiezyklen angesetzt. Die eingesetzte Höhe der therapeutischen Aktivität soll, zusammen mit einem ausreichenden Abstand zwischen den zwei Therapiezyklen eines Versuchs, einen therapeutischen Effekt bewirken, bei dem nur moderate Nebenwirkungen zu erwarten sind. Die Anwesenheit der  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine wird über  $^{68}\text{Ga}$ -Sans im  $\mu\text{PET}$  evaluiert. Wie in

der Praxis üblich erhalten auch die Mäuse parallel zur Therapie eine Flüssigkeitssupplementierung sowie eine Aminosäurelösung zur Nephroprotektion. Besonderes Augenmerk wird zudem auf die Auswirkung der eingesetzten Therapie auf die Nierengesundheit gelegt. Hierzu werden prä- und posttherapeutische  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien Aufschluss geben. Zudem werden Harnstoff und Kreatinin als nierenspezifische Blutparameter am Ende des Versuchs bestimmt sowie eine histologische Aufbereitung der Nieren vorgenommen. Leukozyten- und Thrombozytenwerte sollen zur Evaluierung der Auswirkung der Therapie auf das Knochenmark herangezogen werden.

Für die Überprüfung der komplexen Vorgänge und der möglichen pathologischen Veränderungen ist ein physiologisches System und somit der Einsatz eines Tiermodells für diese Studie unumgänglich. Das Generieren der umfangreichen Parameter in dieser Studie soll gleichzeitig Aufschluss über die diversen Auswirkungen der Behandlung mit den angesetzten Therapeutika geben, sodass für die unterschiedlichen Fragestellungen nicht wiederholt Mäuse für weitere Versuche eingesetzt werden müssen. Dem Wohlbefinden und der Lebensqualität jeder einzelnen Maus werden hierbei als wichtige Kriterien für den schonenden Einsatz der Therapie sowie für deren Wirksamkeit als kliniknahe Beurteilungsparameter ein sehr hoher Stellenwert eingeräumt. In Anbetracht dessen ist auch die ethische Vertretbarkeit der Versuche in dieser Studie gegeben.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Chemikalien und Medikamente

Cutasept® F Hautdesinfektion	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Dermabond™ Mini, Hautkleber	Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland
Dexpanthenol, Bepanthen® 5%, Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ethanol 70%, vergällt	Otto Fischer GmbH und Co KG, Saarbrücken, Deutschland
FBS Superior (fetales Kälberserum)	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Formalin 10 %	TU München, München, Deutschland
Horse Serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Incidin® Liquid	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Deutschland
Isofluran CP® (Isofluran)	CP-Pharma HGmbH, Burgdorf, Deutschland
L-Glutamine	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Metacam® (Meloxicam)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Mykoplasma Off™	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco® by Life Technologies, Paisley, UK

## 2. Lösungen

### 2.1 Injektionslösungen

Aminosäurelösung zur Nephroprotektion (Lösung zur intravenösen Infusion)  
(Apotheke Klinikum der Universität München)

1000 ml enthalten:

L-Agininhydrochlorid 30,16 g; L-Lysinhydrochlorid 31,31 g; Wasser für  
Injektionszwecke 750,0 ml; Natriumchloridlösung 0,9% zu 1000,0 ml;

hypertone Lösung

steril und pyrogenfrei

Isotonische Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung 0,9%)

(Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland)

100 ml enthalten:

Natriumchlorid 0,9 g; Wasser für Injektionszwecke; Salzsäure 25 %,  
Natriumhydroxid;  $\text{Na}^+$  0,154 mmol/ml;  $\text{Cl}^-$  0,154 mmol/l

### 2.2 Zellkulturmedien

RPMI Medium 1640

(Gibco<sup>®</sup> by Life Technologies<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA)

ohne L- Glutamine

RPMI Medium 1640 (ATCC-Modification)

(Gibco<sup>®</sup> by Life Technologies<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA)

D-Glucose (4,5 g/L); HEPES Buffer (2,383 g/L); L-Glutamine;  
Sodium Bicarbonate (1,5 g/L); Sodium Pyruvate (110 mg/L)



### 3. Geräte und Materialien

y-Counter, Cobra Quantum5003	Packard Instrument Company Inc., Downers Grove, IL, USA
y-Kamera, Philips-Prism 3000 XP	Philips Medical Systems, Inc., Cleveland, OH, USA
μPET-Scanner, Invenion P120	Siemens AG, München, Deutschland
Analysenwaage CP224S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Aktivimeter (Ionisationskammer) Typs VDC-202	Comecer S.p.A., Castel Bolognese, Italien
BD Microlance™ 3 Kanülen (26G, 27G, 30G)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Castroviejo Micro Needle Holder	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Cryovials Cryo.s™ 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Tubes®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcons Cellstar® 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Fine Bore Polyethylen Tubing	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Deutschland
Insulinspritzen BD-Micro-Fine™ 0,5ml, 29G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kompaktwaage Soehnle Professional 9202	Soehnle Industrial Solutions GmbH, Backnang, Deutschland
Lithium-Heparin-Röhrchen, 1,3 ml	Laboklin GmbH & Co.KG, Bad Kissingen, Deutschland
Mikroskop, 471202-9901	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowaage CPA26P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Narkosegerät, Isofluran Med. Vet. Vapor	Drägerwerk AG & Co KGaA, Lübeck, Deutschland

Norm-Ject <sup>®</sup> Tuberculin 1ml Einmalspritze	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Objektträger (für Blutausstriche)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning <sup>®</sup> , Costar <sup>®</sup> Stripetten <sup>®</sup> , Corning, NY, USA
Pipettenspitzen Eppendorf Dualfilter T.I.P.S. <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettiertgeräte, Pipetboy Comfort	IBS Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
PS-Röhrchen, 5ml + Griffstopfen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Scepter <sup>™</sup> (Zellzählgerät)	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Scepter <sup>™</sup> -Sensor-60 µl	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Schiebelehre Traceable <sup>®</sup>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank HeraSafe <sup>®</sup> HSP12	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Thermofol-Wärmefolie	Thermo-Flächenheizung GmbH, Rohrbach, Deutschland
Wärmeunterlage, ThermoLux <sup>®</sup>	Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland
Zählkammer C-Chip, Neubauer Improved	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Zellkulturflaschen Filter 75cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## 4. Programme

AMIDE 1.0.5.	Medical Imaging Data Examiner, Free Software Tool, <a href="http://amide.sourceforge.net">http://amide.sourceforge.net</a>
Hermes Dynamic Study Display	Version 4.0 (Hermes Gold V2.10) Hermes Medical Solutions, Stockholm, Schweden/London, GB
Invenion Aquisition Workplace	Version 1.5.0.28, Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA
Matlab V. 2011	The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA
Microsoft Excel (2010 u. 2013)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
IBM SPSS Statistics 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

## 5. iRGD

### 5.1 iRGD zur Koinjektion

Das zur Koinjektion verwendete iRGD-Peptid cyclo[CRGDKGPDC]-CONH<sub>2</sub> wurde über die ITG Isotop Technologies Garching GmbH in Garching bei München von der Iris Biotec GmbH aus Marktredwitz bezogen. Das Peptid wurde als gefriergetrocknetes Pulver mit einer Reinheit von 98 % geliefert. Das Pulver wurde für die Anwendung bei den Mäusen, zu je 3 mg aliquotiert und in 1,5 ml isotonischer NaCl-Lösung gelöst. In der erzeugten Lösung waren somit 200 µg des Peptids in 100 µl NaCl-Lösung enthalten, was der Dosierung (je Applikation) von 8 µmol/kg für eine Maus entsprach (Sugahara et al., 2009; Akashi et al., 2014).

### 5.2 iRGD zur Kopplung mit <sup>68</sup>Ga

Das iRGD-Peptid zur Kopplung an <sup>68</sup>Ga für die µPET-Scans wies dieselbe Grundstruktur auf wie das iRGD zur Koinjektion, war allerdings bereits mit dem Chelator DOTA modifiziert (Sitz am N-terminalen Ende des iRGD). Bezogen wurde dieses Peptid ebenfalls über die ITG Isotop Technologies Garching GmbH in Garching bei München, Deutschland von der Iris Biotec GmbH aus Marktredwitz, Deutschland.

## 6. Radionuklide und Herstellung der Radiopharmaka

### 6.1 [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid

Das  $^{177}\text{Lu}$  Lutetium ( $^{177}\text{Lu}$ ) wurde über die ITG Isotop Technologies Garching GmbH in Garching bei München, Deutschland, bezogen. Die Herstellung des  $^{177}\text{Lu}$  war dort über das von diesem Unternehmen patentierte Verfahren erfolgt, bei dem über eine indirekte Kernreaktion durch die Bestrahlung von  $^{176}\text{Yb}$  (Ytterbium) zunächst das kurzlebige  $^{177}\text{Yb}$  entsteht, das anschließend zu  $^{177}\text{Lu}$  zerfällt. Die  $\beta^-$ -Strahlung wird für therapeutische Zwecke genutzt, die  $\gamma$ -Strahlung kann im  $\gamma$ -Counter in den Biodistributionsstudien detektiert werden (siehe auch II. 2.3.1 und 2.4.1). Das  $^{177}\text{Lu}$  wurde in flüssiger Form als Lutetium-Chloridlösung geliefert. Die Radionuklidreinheit betrug  $\geq 99,0\%$ . Die Synthese des Radiopharmakons [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) erfolgte in der Radiopharmazie der Nuklearmedizin der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums Großhadern (Klinikum der Universität München, Deutschland). Eine radiochemische Reinheit von  $> 95\%$  wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie erreicht. Der pH-Wert wurde auf ein physiologisches Niveau von pH 7,4 eingestellt. Die zur Therapie verabreichten 25 MBq bzw. 50 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurden mit isotonischer NaCl-Lösung auf ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

### 6.2 $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD

Der  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Mutter/Tochternuklidgenerator wurde ebenfalls über die ITG Isotop Technologies Garching GmbH in Garching bei München bezogen. Dieser Generator stellt auch ein Patent des genannten Unternehmens dar. Das DOTATOC wurde über die ITG Isotop Technologies Garching GmbH von der ABX GmbH, Radeberg, Deutschland, bezogen. Die Synthese des Tracers  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD erfolgte in der Radiopharmazie der Nuklearmedizin der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums Großhadern. Eine radiochemische Reinheit von  $> 95\%$  wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie erreicht. Der pH-Wert wurde auf ein physiologisches Niveau von pH 7,4 eingestellt.

### **6.3 $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>**

Die Herstellung von  $^{99m}\text{Tc}$  mit einem  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Mutter/Tochter- Nuklidgenerator (Mallinckrodt Pharmaceuticals, Dublin, Irland; GE Healthcare Buchler GmbH und Co KG, Braunschweig, Deutschland; CIS Bio GmbH, Berlin, Deutschland) sowie dessen MAG<sub>3</sub>-Markierung über ein Kit-System (Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Niederlande) erfolgte im Rahmen der täglichen Routine durch eine / einen Medizinisch-technischen Radiologieassistenten der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums Großhadern. Das Produkt wies stets eine radiochemische Reinheit von  $\geq 95\%$  auf. Der pH-Wert wurde auf ein physiologisches Niveau von pH 7,4 eingestellt.

## **7. Zelllinien und Zellkultur**

### **7.1 AR42J: Azaserin-induziertes Pankreasadenokarzinom der Ratte**

Die AR42J-Zelllinie (ATCC<sup>®</sup> CRL-1492TM) des Azaserin-induzierten Pankreasadenokarzinoms der Ratte wurde von der European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) bzw. American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) bezogen.

### **7.2 NCI-H69: humanes kleinzelliges Lungenkarzinom**

Die Tumorzelllinie NCI-H69 (ATCC<sup>®</sup> HTB-119<sup>TM</sup>), als Vertreter des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms, wurde über die American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, erworben.

### **7.3 Kultivierung der Zellen**

#### **7.3.1 AR42J**

Die adhärent wachsenden Zellen der AR42J-Zelllinie wurden in RPMI Medium 1640, dem 10 % FKS (fetales Kälberserum) bei den Zellen der ECACC bzw. 20 % FKS bei den Zellen der ATCC und 5 ml L-Glutamin zugegeben worden war, bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Verwendung zweier verschiedener Konzentrationen des FKS beruht auf den unterschiedlichen Angaben in den dazugehörigen Datenblättern. Dem Wachstumsmedium wurde bewusst kein Antibiotikum zugesetzt. Der Medienwechsel und die Subkultivierung der Zellen erfolgten unter aseptischen

Bedingungen an der Sicherheitswerkbank HeraSafe® HSP12 (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland). Das Zellmedium, die Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) und das Trypsin-EDTA (EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure) wurden vor jeder Arbeit mit den Zellen im Wärmebad auf 37 °C erwärmt.

Nach dem Auftauen der Zellen wurden die Zellen mit 1100 rpm (revolutions per minute) für 4 min zentrifugiert und der Mediumüberstand mit einer Pipette vorsichtig abgezogen. Nach Zugabe von 5 ml frischen Wachstumsmediums wurden die Zellen gut resuspendiert und in eine T75 Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) mit Wachstumsmedium überführt. Nach 5–6 Tagen Wachstumszeit im Brutschrank und einmalig erfolgtem Mediumwechsel in diesem Zeitraum konnten diese in die nächstgrößere Kulturflasche T150 (150 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) überführt werden, das einem Subkultivierungsverhältnisses von 1 : 2 entsprach. Danach erfolgte regelmäßig nach 5 Tagen ein die Subkultivierung, das sog. Passagieren, im Verhältnis 1 : 5. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Sowohl für die Subkultivierung der Zellen als auch für den Mediumwechsel musste das Wachstumsmedium mit einer Pipette abgesaugt werden. Anschließend wurden zur Befreiung des Zellrasens von Mediumresten und Zelldetritus 20 ml PBS zugegeben und nach leichtem Schwenken wieder abgezogen. Anschließend wurde wieder 25 ml frischen Wachstumsmediums zugegeben.

Für die oben erwähnte Subkultivierung erfolgte zunächst die Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung je Kulturflasche (150 cm<sup>2</sup>), was eine enzymatische Ablösung der adhärennten Zellen bewirkt. Nach einer Wartezeit von ca. 5–10 min hatten sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst. Während der Wartezeit wurden die neuen Zellkulturflaschen für die Subkultivierung beschriftet und mit jeweils 23 ml frischen Wachstumsmediums befüllt. Zur Unterbrechung der enzymatischen Reaktion des Trypsin-EDTA wurden anschließend 7 ml des Wachstumsmediums zugegeben. Die Resuspendierung der Zellsuspension mit einer 10 ml-Pipette bewirkte ein Vereinzeln der Zellen für eine gleichmäßige Verteilung in der neuen Zellkulturflasche. Für ein Subkultivierungsverhältnis von 1 : 5 wurden von der Zellsuspension jeweils 2 ml in die neuen Zellkulturflaschen gegeben.

### 7.3.2 NCI-H69

Anders als bei der AR42J-Zelllinie wachsen die NCI-H69-Zellen in einer Suspensionskultur in Zellaggregaten. Die Zellen dürfen nicht gänzlich vereinzelt werden, da diese sonst ihre Lebensfähigkeit verlieren. Die Umdrehungszahl beim Zentrifugieren durfte daher nur 705 rpm betragen, die Zeit von 4 min wurde auch hier gewählt. Ein Zentrifugieren fand auch nur nach dem Auftauen und für die Tumornokulation statt. Die NCI-H69-Zellen wurden in RPMI Medium 1640 (ATCC-Modifikation), einem Zusatz von 10 % FKS, bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Dem Wachstumsmedium wurde kein Antibiotikum zugegeben. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen an der bereits genannten Sicherheitswerkbank.

Der Vorgang für das Auftauen der Zellen und das Anlegen einer Startkultur erfolgte analog zu den AR42J-Zellen, allerdings mit der bereits erwähnten Umdrehungszahl beim Zentrifugieren.

Die Kultivierung fand zunächst für 2–3 Tage in einer T75-Kulturflasche statt. Für die Überführung der Zellen in eine T150-Kulturflasche mit 20 ml frischen Wachstumsmediums wurde die Kulturflasche mit den Zellen für 10-15 min aufgestellt, sodass sich die in Suspension befindlichen Zellen am Flaschenrücken sammelten und vorsichtig ein Teil des alten Mediums abgezogen werden konnte. Zur Verkleinerung der Zellaggregate im verbliebenen Medium wurde vorsichtig resuspendiert und die Zellsuspension anschließend in die neue Kulturflasche pipettiert. Das entsprach einem Subkultivierungsverhältnis von 1 : 2.

Nach dieser ersten Subkultivierung erfolgte alle 4–5 Tage ein Passagieren im Verhältnis 1 : 4. Jeweils nach 2 Tagen wurden 20 ml frischen Mediums zugegeben, sodass die gesamte Zellsuspension zum Zeitpunkt des nächsten Passagierens ein Volumen von ca. 45 ml hatte. Für das Passagieren wurden T150-Kulturflaschen mit 15 ml frischen Wachstumsmediums vorbereitet und jeweils 10 ml von der Zellsuspension zugegeben. Zuvor war die Zellsuspension nochmals vorsichtig mit einer 10-ml-Pipette resuspendiert worden, um die Zellaggregate zu verkleinern.

#### 7.4 Vorbereitung der Zellen für die subkutane Inokulation

Einen Tag vor der geplanten Inokulation der Zellen in die Mäuse wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Dieser erfolgte bei den adhärent wachsenden AR42J wie bereits beschrieben. Bei den NCI-H69-Suspensionszellen wurden die einzelnen Flaschen jeweils für 10–15 min aufgestellt, sodass sich die schwimmenden Zellen am Boden der Kulturflaschen sedimentieren konnten und ein Teil des alten Mediums ohne gravierende Zellverluste abgesaugt werden konnte. Danach wurde die gleiche Menge frischen Wachstumsmediums dazu gegeben.

Für die subkutane Inokulation der Zellen wurde die Zellsuspension aus den jeweiligen Kulturflaschen in 50-ml-Falcons gesammelt und zentrifugiert. Bei den adhärennten AR42J war ein vorheriges enzymatisches Ablösen der Zellen wie oben beschrieben erforderlich. Das überständige Medium wurde mit einer Pipette abgesaugt. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen aus den Falcons in 800–1000 µl ihres entsprechenden Mediums ohne Zusätze aufgenommen und in 5-ml-Eppendorf-Tubes gesammelt. Für die Zählung der Zellen wurde eine Verdünnung von 1 : 200 angelegt. Die Zählung der Zellen konnte bei den AR42J-Zellen mit einem sog. Scepter erfolgen, bei den NCI-H69-Zellen war eine manuelle Zählung mit einer Neubauer Zählkammer (C-Chip) erforderlich. Die Ermittlung der insgesamt vorhandenen Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Ergebnis der Zählung (Zellzahl/ml)} \times 200 \times \text{ml an Zellsuspension} = \text{Gesamtzahl der Zellen}$$

Zur Einstellung der gewünschten Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen in 100 µl musste das vorliegende Volumen in Millilitern [ml] der Zellsuspension noch mit Medium ohne Zusätze verdünnt werden. Dazu war folgende Rechnung erforderlich:

$$\frac{\text{Gesamtzahl der Zellen in Eppendorf Tube (in Mio.)}}{50 \text{ Mio.}} = \text{erforderliches Gesamtvolumen in ml}$$

Für die Zellinjektion erfolgten bei den AR42J-Zellen kein Passagieren über mehr als 20 Passagen für die Biodistributionsstudie und kein Passagieren über 13 mehr als Passagen für die Therapieversuche. Für die Biodistributionsstudie mit den NCI-H69-Tumoren wurde nicht öfter als 15-mal passagiert nicht überschritten.



## 8. Tiermodell

Alle unternommenen Tierexperimente wurden gemäß §8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313) im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchs mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-9-12 durchgeführt.

### 8.1 Versuchstiere und Haltung

Für sämtliche Tierversuche wurden weibliche SCID-Hairless-Outbred-Mäuse (SHO<sup>TM</sup> Mouse; Crl: SHO-Prkdc<sup>scid</sup> Hr<sup>hr</sup>) verwendet. Diese Tiere wurden mit einem Alter von 6 bis 8 Wochen aus einer spezifisch pathogenfreien Zucht (Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Diese Mauslinie ist speziell für die Tumorforschung gezüchtet. Es handelt sich um eine haarlose Albinomauslinie, die sich durch eine homozygot vererbte Immundefizienz auszeichnet (Charles River Laboratories International, 2008). Bei dieser Form der Immundefizienz fehlt eine Differenzierung von Stammzellen in T- und B-Lymphozyten, wobei natürliche Killerzellen aber weiterhin gebildet werden. Die schwere Immuninkompetenz (SCID = severe combined immunodeficiency) bedingt nach einer Injektion von Tumorzellen ein effizienteres Anwachsen von Tumoren (Clifford & Pritchett-Corning, 2009; Liang et al., 2009).

Die Tiere wurden in einem IVC-System (Individually Ventilated Cages, Sealsafe IVC - Blue Line Typ III, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) zu je 5 bis 6 Tieren gehalten. In einer IVC-Anlage ist jeder Einzelkäfig als geschlossene Einheit anzusehen, die individuell mit HEPA-gefilterter Luft versorgt wird. Durch diese Anlage werden die Tiere von äußeren Reizen abgeschirmt und vor mikrobiellen Einflüssen geschützt. Für eine Gewährleistung der nach der nach der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) erforderlichen 45–65 % Luftfeuchte, einer Temperatur von 24–26 °C und eine Luftwechselrate von 25 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> Grundfläche (10-facher Luftwechsel/h) wurde Sorge getragen. Die Kontrolle dieser Parameter erfolgte täglich. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde über Hell- und Dunkelphasen, die von jeweils zwölfstündiger Dauer waren, nachgestellt.

Die einzelnen IVC-Käfige waren mit Weichholzgranulat (Lignocel<sup>®</sup> BK8-15, Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, Rosenberg, Deutschland) eingestreut und

wurden mit ein bis zwei Häuschen (Tecniplast Mouse House<sup>TM</sup>, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland), einem Mouse Igloo oder Crawl Ball (Bio-Serv®, NJ, USA) aus rotem Polycarbonat, ausreichend Nestmaterial (Nestles und Coccons, Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) und autoklavierbaren Nagehölzern (Lignocel® Top Brick, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, Rosenberg) ausgestattet. Der freie Zugang zu standardisiertem Alleinfutter (Ssniff M+Z Extrudat, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und zu Trinkwasser ad libitum war stets gewährleistet. Das Umsetzen der Mäuse in frische Käfige erfolgte einmal wöchentlich unter einer Laminar-Flow-Arbeitswerkbank (Biosafety Changing Station BS48, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland). Das Erneuern des Wassers und das Auffüllen der Futtertröge erfolgten regelmäßig zum Zeitpunkt des Umsetzens sowie nach Bedarf. Darüber hinaus wurden gemäß den Richtlinien der Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Sentinels („dirty bedding sentinels“) gehalten, die vierteljährlich zur Hygienekontrolle an ein zertifiziertes Labor eingesendet wurden.

Nach Ankunft der Mäuse wurde diesen mindestens eine Woche Zeit zur Akklimatisierung gegeben, bevor sie für die Versuche eingesetzt wurden.

## **8.2 Anästhesie und Euthanasie**

Ein Narkotisieren der Mäuse erfolgte durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran. Zur Einleitung der Narkose wurden die Mäuse in eine mit 2%iger Isoflurankonzentration im Sauerstoff, vorgeflutete Narkosebox aus rotem Plexiglas gesetzt. Die Sauerstoff-Durchflussrate betrug hierbei 2 l/min. Während der Narkoseeinleitung wurden die Tiere ständig überwacht und der Verlust der Stellreflexe überprüft. Die Aufrechterhaltung der Narkose fand anschließend über eine Nasenkammer statt. Hier betrug die Isoflurankonzentration zwischen 1,5 % und 1,8 % und die Sauerstoff-Durchflussrate wurde bei 2 l/min belassen. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig über den Zwischenzehenreflex und die Regelmäßigkeit der Atmung überprüft. Zur Vermeidung einer Hypothermie, aufgrund des narkosebedingt reduzierten Stoffwechsels, wurden die Mäuse während der Narkose auf einer Wärmematte platziert. Zum Schutz der Cornea vor Austrocknung und der empfindlichen roten Augen vor Licht wurde routinemäßig lokal ausreichend Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen®) aufgetragen.

Die Euthanasie der Mäuse erfolgte in tiefer Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation.

### **8.3 Anlegen eines Katheters zur intravenösen Applikation**

Aufgrund der geringen Größe der Mäuse waren kommerziell erhältliche Katheter nicht anwendbar. Diese wurden daher aus einem Polyethylenschlauch mit 0,28 mm Innendurchmesser und 0,61 mm Außendurchmesser (Fine Bore Polyethylen Tubing, Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Deutschland) und 30G-Kanülen selbst angefertigt. Die Länge der Katheter variierte von 6 cm für die Applikation von Tracern bei  $\mu$ PET-Scans und Nierenszintigraphien und 4 cm zur Verabreichung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Für das Anlegen der Katheter wurden die Mäuse wie unter III. 8.2 beschrieben in Narkose gelegt bzw. gehalten. Die Schwanzvene wurde leicht gestaut, die Kanüle des Katheters mit einem kleinen Nadelhalter gefasst und vorsichtig in die laterale Schwanzvene geschoben. Das Einfließen von Blut in den Katheter zeigte die korrekte intravenöse (i. v.) Platzierung der Kanüle an. Für Messungen im  $\mu$ PET-Scanner und für die  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie wurde der Katheter mit einem stecknadelkopfgroßen Tropfen Hautkleber, der den freiliegenden Teil der Kanüle am Schwanz fixierte, und mit einem Streifen Gewebeklebeband an einem darunter liegenden Tupfer befestigt. Bei den Therapieversuchen erfolgte die Fixierung des Katheters zur Schonung der Haut nur mit einem Gewebeklebeband an einem darunter liegenden Tupfer. Zur Verhinderung eines intravenösen Luftembolus wurde vor jeder Applikation der Konus des Katheters mit isotonischer NaCl-Lösung vollständig aufgefüllt. Hatte sich beim Ansetzen der Spritze zur Applikation das sich im Katheter befindende Blut zurückgezogen, war sichergestellt, dass die der intravenösen Lage der Kanüle korrekt ist.

Die leere Spritze, der Katheter und der Tupfer wurden nach der Applikation der Aktivität im Aktivimeter rückgemessen, um die tatsächliche (effektive) Höhe der injizierten Aktivität errechnen zu können.

## 9. Tierexperimente

### 9.1 Erzeugung solider, subkutaner Tumoren

Bei den jeweiligen Tumorinokulationen wurden den Mäusen  $5 \times 10^6$  der AR42J-Zellen in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  (Miederer et al., 2008; Graf et al., 2014) bzw.  $7,5 \times 10^6$  der NCI-H69-Zellen entsprechend in einem Volumen von 150  $\mu\text{l}$  (Kostenich et al., 2005; Lewin et al., 2015) subkutan (s. c.) an die rechte Flanke injiziert. Dazu wurden die Mäuse im sog. Mäusegriff gehalten, bei dem sie in einer Hand mit zwei Fingern im Nacken und zwei Fingern am Schwanz fixiert werden, um so das entsprechende Volumen der Zellsuspension mit einer 26G-Kanüle sicher unter die Haut zu injizieren.

### 9.2 $\mu\text{PET}$ -Messungen mit $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD zur Darstellung der $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine

Zur Bestätigung der Anwesenheit der  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinrezeptoren wurden bei einzelnen tumortragenden Mäusen exemplarisch statische und dynamische Messungen im  $\mu\text{PET}$  mit dem spezifisch bindenden  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD-Tracer angefertigt. Die Mäuse erhielten  $20 \pm 5$  MBq in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  des radioaktiven Tracers i. v. über einen Katheter in die laterale Schwanzvene, der, wie unter III. 8.3 beschrieben, zuvor angelegt worden war. Ein Nachspülen des Katheters erfolgte mit 100  $\mu\text{l}$  isotonischer NaCl-Lösung.

Bei statischen Aufnahmen wurde nach der Tracer-Applikation und dem Nachspülen des Katheters dieser vorsichtig entfernt und man ließ die Mäuse wieder aufwachen, damit sich der Tracer über eine Zeit von 45 min im Körper verteilen konnte. Nach dieser Zeit wurden die Mäuse erneut in Narkose gelegt und unterliefen paarweise im  $\mu\text{PET}$ -Scanner eine Messung mit einer Dauer von 30 min.

Dynamische  $\mu\text{PET}$ -Scans dauerten 90 min. Hierzu wurden die narkotisierten Mäuse ebenfalls paarweise auf dem Scanner gelagert, der Tracer wurde allerdings erst zum Zeitpunkt des Starts der Aufnahmen appliziert. Die Spritzen mit den radioaktiven  $^{68}\text{Ga}$ -Tracern wurden bei beiden Mäusen gleichzeitig angesetzt. Nachdem eine zweite Person am Computer das Startsignal gegeben hatte wurde bei der ersten Maus der Tracer langsam appliziert, etwas zeitversetzt schließlich bei der zweiten Maus. Es folgte ein Nachspülen mit 100  $\mu\text{l}$  NaCl-Lösung. Die

Mäuse wurden zu jedem Zeitpunkt durch die Lagerung auf Wärmematten vor einer Unterkühlung geschützt. Alle Daten über die Messung wurden in einem Scanprotokoll festgehalten.

Für die Auswertung der Bilder war zunächst eine sog. Rekonstruktion der Aufnahmen erforderlich. Diese erfolgte über die Invenion Aquisition Workplace (Version 1.5.0.28, Siemens Medical Solutions, USA). Die Bearbeitung der Bilder bzw. vorgenommene Auswertungen fanden mit der Software AMIDE 1.0.5. statt. Um die Anwesenheit der oben genannten Rezeptoren zu evaluieren, wurde die Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe mit jener der kontralateralen Seite verglichen und das Verhältnis berechnet. Die kontralaterale Seite stellt den Referenzbereich für neutrales Gewebe, wie etwa Muskulatur, dar. Zunächst wurden sog. „volumes of interest“ (VOIs) in die entsprechenden Bereiche hineingelegt. Für die detektierte Strahlung in den einzelnen VOIs für Tumor und die kontralaterale Seite ermittelte das Programm die Mittelwerte (MW) innerhalb der VOIs. Aus jenen MW wurde für jede Maus das Verhältnis (MW VOI Tumor / MW VOI Kontralaterale) berechnet. Das Endergebnis errechnete sich als Mittelwert aus den Verhältnissen für die jeweiligen Tumoren der gescannten Mäuse je Zelllinie.

### **9.3 Aktivitätsanreicherung in Nieren und Tumoren**

Entsprechend des Therapievorhabens sollte vorher eine Evaluierung von Anreicherung und Verteilung des applizierten Radionuklids  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im Zusammenhang mit der Koinjektion des iRGD in Nieren und im Tumorgewebe stattfinden.

#### **9.3.1 Biodistribution und Dosimetrie an NCI-H69-tumortragenden Mäusen**

In einem ersten Ansatz wurden weiblichen SHO-Mäusen  $7,5 \times 10^6$  NCI-H69-Zellen s. c. an der rechten Flanke appliziert. Den NCI-H69-Flankentumoren wurde eine Wachstumszeit von 8 Wochen gewährt. Nach dieser Zeit erfolgte eine randomisierte Aufteilung der tumortragenden Tiere in zwei Gruppen, denen 1 h vor der intravenösen Applikation von  $1,7 \pm 0,3$  MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC intraperitoneal (i. p.) eine Koinjektion einer iRGD- bzw. NaCl-Lösung verabreicht wurde. Das  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurde den, in einer Röhre fixierten, Mäusen mit einer Insulinspritze über die laterale Schwanzvene appliziert. Eine

Gruppe erhielt zusätzlich 200 µg (8 µmol/kg) des iRGD-Peptids cyclo(CRGDKPDC)-CONH<sub>2</sub>, das in 100 µl isotonischer NaCl-Lösung gelöst war (im Folgenden iRGD-Gruppe bzw. in Tabellen und Diagrammen im Ergebnisteil <sup>177</sup>Lu-DOTATOC + iRGD bezeichnet). Die zweite Gruppe bekam alternativ 100 µl reine isotonische NaCl-Lösung i. p. gespritzt (im Folgenden NaCl-Gruppe bzw. in Tabellen und Diagrammen <sup>177</sup>Lu-DOTATOC + NaCl bezeichnet). Die jeweiligen Gruppen wurden weiter in Gruppen zu je 5 Tieren unterteilt, die wiederum nach 24 h, 48 h und 72 h geopfert wurden. Vor der Euthanasie am jeweiligen Tag wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt. Anschließend wurde bei den Mäusen unter tiefer Isoflurannarkose intrakardial Blut entnommen. Nach erfolgter Euthanasie der Tiere mittels zervikaler Dislokation wurden linke und rechte Niere und der Tumor sowie der Oberschenkelmuskel, der als Referenzorgan für neutrales Gewebe diente, entnommen. Ein Tumor-Muskel-Verhältnis stellt einen Faktor für einen Vergleich der Aktivitätsanreicherung in neutralem Gewebe und in den Tumoren dar. Das entnommene Probenmaterial wurde unmittelbar nach der Entnahme in vorher beschriftete und in leerem Zustand gewogene Messröhrchen (PS-Röhrchen) überführt. Aus der Differenz des Gewichtes des leeren Messröhrchens und des Gewichtes des nun in vollem Zustand auf derselben Mikrowaage gewogenen Messröhrchens errechnete sich das Gewicht der jeweiligen Proben. Die Probenröhrchen wurden in den γ-Counter verbracht. Die im γ-Counter gemessene Aktivität sämtlicher Proben wurde in „counts per minute“ (cpm) als halbwegszeitkorrigierter Wert wiedergegeben. Dazu wurde die Anzahl der Counts eines jeden Probenröhrchens einzeln über eine Minute erhoben und von dieser auf die eingegeben Referenzzeit (Uhrzeit der <sup>177</sup>Lu-DOTATOC-Applikation) zurückgerechnet. Die Werte für die Auswertung werden in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewicht der Probe [%ID/g] angegeben.

Zusätzlich wurden zu Messbeginn im γ-Counter die sog. Standards, je vier Messröhrchen mit 2 µl, 5 µl und 10 µl reinen <sup>177</sup>Lu-DOTATOC, gemessen. Sie dienten der Validierung der Anzahl der Counts in der Masse in [g] der zubereiteten Aktivität.

Für eine Abschätzung der zu erwartenden Dosis in Nieren und Tumor wurden hierfür die Dosiswerte nach den Richtlinien des Komitees der Medical Internal Radiation Dose, unter Verwendung eines mono-exponentiellen Dosismodells,

berechnet (Loevinger & Berman, 1968). Bei diesem Prinzip basiert die Berechnung für die Organselbstdosis durch  $\beta$ -Strahlung auf der Multiplikation aller in einer Zielregion stattfindenden radioaktiven Zerfälle mit einem gewebe-spezifischen S-Wert, welcher die deponierte Strahlendosis pro radioaktiven Zerfall angibt. Für die Berechnung aller radioaktiven Zerfälle in einem Gewebe wurden in festgelegten zeitlichen Abständen Aktivitätsmessungen für jedes Organ durchgeführt. Anschließend wurden diese Messpunkte an das oben genannte mono-exponentielle Dosismodel gefittet und integriert, um alle stattfindenden Zerfälle zu berechnen (Delker et al., 2015).

Das Generieren der Dosiswerte erfolgte von der Abteilung für Physik der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums Großhadern (Böning, Vomacka, Gosewisch).

### **9.3.2 Biodistribution und Dosimetrie an AR42J-tumortragenden Mäusen**

Bei einer weiteren Biodistributionsstudie wurde die Anreicherung und Verteilung der Aktivität bei weiblichen SHO-Mäusen mit Flankentumoren der AR42J-Zelllinie untersucht. Das Vorgehen, die Höhe der applizierten Aktivität, die Koinjektionen, die Probenentnahme sowie die Mess- und Auswertungsmethoden entsprachen jenen, die unter III. 9.3.1 beschrieben wurden. Allerdings erfolgten bei der Biodistribution im Falle der AR42J-tumortragenden Mäuse einige Abweichungen zu der vorangegangenen Biodistributionsstudie. So wurde eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$  der AR42J-Zellen s. c. an die rechte Flanke injiziert. Den Tumoren wurde eine Wachstumszeit von 12 Tagen gewährt. Eine randomisierte Einteilung in eine iRGD- und eine NaCl-Gruppe fand ebenfalls statt, die weitere Unterteilung erfolgte jedoch in Gruppen zu je 4 Tieren. Die ursprünglichen drei Messzeitpunkte nach 24 h, 48 h, 72 h wurden um zwei zusätzliche Messzeitpunkte nach 120 h und 168 h nach der Aktivitätsapplikation erweitert.

### **9.3.3 Statistische Bewertung**

Die statistische Auswertung zu signifikanten Unterschieden bezüglich der Aktivitätsverteilung für Nieren und Tumoren sowie des Tumor-Muskel-Verhältnisses zwischen der iRGD- und NaCl-Gruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte durch den nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben im SPSS-Programm, wobei  $p < 0,05$  als signifikant und  $p < 0,01$  als hoch signifikant galten. Die Berechnung erfolgte zweiseitig.

#### **9.4 Therapieversuche mit $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC an AR42J-tumortragenden Mäusen – allgemeines Vorgehen**

Für die Therapieversuche wurden weiblichen SHO-Mäusen  $5 \times 10^6$  AR42J-Zellen s. c. an die rechte Flanke injiziert. Die Einteilung der Tiere erfolgte zuvor randomisiert in je zwei Therapiegruppen und eine nicht therapierte Kontrollgruppe. Die Anzahl der Mäuse wurde in der jeweiligen Kontrollgruppe aus Tierschutzgründen reduziert (3R-Prinzip: Reduction, Replacement, Refinement), da aus einem früheren Pilotversuch sowie aus der Biodistributionsstudie die 100%ige Anwachsrate und das aggressive Wachstumsverhalten der AR42J-Tumoren bekannt war. Die einzelnen Mäuse wurden mittels Ohrlochung markiert. Eine Woche nach der Zellinjektion, bei makroskopisch erkennbaren und messbaren Flankentumoren, wurde die Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC eingeleitet. Der Tag, an dem mit der Therapie begonnen wurde, wurde mit Tag 0 bezeichnet. Die Höhe der verabreichten Aktivität wurde für die Therapie so gewählt, dass ein therapeutischer Effekt zu erwarten war (Schmitt et al., 2004; Graf et al., 2014), jedoch nur mit moderaten toxischen Nebenwirkungen gerechnet werden musste (Ilhan, 2013). Die Aktivität wurde mit isotonischer NaCl-Lösung auf ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  verdünnt und über einen Katheter in die laterale Schwanzvene, wie unter III. 8.3 beschrieben, appliziert. Ein Nachspülen mit NaCl-Lösung erfolgte in diesem Fall nicht. Die zu erwartende Höhe des im Katheter verbleibenden  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurde zuvor beim Aufziehen der Aktivität mit einberechnet. Der Kontrollgruppe wurden alternativ 100  $\mu\text{l}$  der NaCl-Lösung verabreicht. Den Tieren in einer Therapiegruppe (im folgenden Text als iRGD-Therapiegruppe bzw. in Tabellen und Diagrammen als  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD bezeichnet) wurde zusätzlich zum therapeutischen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC 200  $\mu\text{g}$  des iRGD-Peptids cyclo(CRGDKPDC)-CONH<sub>2</sub>, in 100  $\mu\text{l}$  isotonischer NaCl-Lösung gelöst, verabreicht (entspricht einer Dosierung von 8  $\mu\text{mol/kg}$ ). Die andere Therapiegruppe (im folgenden Text als NaCl-Therapiegruppe bzw. in Tabellen und Diagrammen als  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl genannt bezeichnet) erhielt alternativ 100  $\mu\text{l}$  isotonische NaCl-Lösung. Diese Koinjektionen wurden in der angegebenen Dosierung nach bestimmten Schemata jeweils i. p. verabreicht (siehe III. 9.5.1.1, III. 9.5.2.1 und III. 9.5.3.1). Des Weiteren erhielten alle Therapietiere sowie die Mäuse in den Kontrollgruppen unterstützend 500  $\mu\text{l}$  i. p. einer L-Arginin-/L-Lysin–Aminosäurelösung (siehe III. 2.1) als Nierenschutz und 500  $\mu\text{l}$  s. c. einer isotonischen NaCl-Lösung zur



Flüssigkeitssubstitution. Zur Evaluierung einer eventuellen Schädigung der Nieren wurde vor der Therapie bei den noch tumorfreien Mäusen sowie gegen Ende des jeweiligen Therapieversuches bei denselben Mäusen eine  $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ -Nierenfunktionsszintigraphie durchgeführt (siehe III. 9.4.3). Am Ende eines Therapieversuches bzw. bei Eintreten der Abbruchkriterien (siehe III. 9.4.5) wurde den Mäusen, bevor sie durch zervikale Dislokation unter tiefer Isoflurannarkose euthanasiert wurden, intrakardial Blut entnommen (siehe III. 9.4.4). Abschließend erfolgte eine makroskopische Beurteilung der Organe. Die einzelnen Therapieversuche mit ihren etwaigen Abweichungen zu der hier im Text allgemein beschriebenen Vorgehensweise werden im Kapitel III. 9.5 detailliert dargestellt.

#### 9.4.1 Überwachung des Tumorummens

Das genaue Ausgangstumorummen wurde am Tag der Therapie (Tag 0) bestimmt. Im Folgenden erfolgte die Tumormessung dann zweimal in der Woche. Die Mäuse wurden im Mäusegriff, wie bereits im Kapitel III. 9.1 beschrieben, fixiert. Zur Ermittlung der Tumorummina wurden bei jedem Tumor die Länge, Breite und Höhe in Millimetern [mm] mit einer Schiebelehre auf zwei Stellen hinter dem Komma genau generiert. Die Formel zur Berechnung der Volumina basiert auf der Umstellung der Formel zur Berechnung eines Ellipsoids:

$$\text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} \times \text{Volumenfaktor } (\pi/6) = \text{Tumorummen in mm}^3$$

Neben dem Tumorummen waren auch stets der Zustand der Tumoroberfläche und die anatomische Lage des Tumors hinsichtlich einer Beeinträchtigung des Bewegungsablaufs wichtige Beobachtungskriterien. Für die Beurteilung der gemessenen Werte wurde bei jeder Maus die absolute Tumorummenänderung (Volumen in [mm<sup>3</sup>] des jeweiligen Messtages - Volumen in [mm<sup>3</sup>] an Tag 0 = Volumenänderung in [mm<sup>3</sup>]) berechnet. Die Bestimmung des Tumorummens erfolgte bis zum Tag der Euthanasie. Die absoluten Volumenänderungen wurde für die vergleichende Auswertung bis zu dem Tag nach Therapiebeginn bewertet, an dem noch kein Tier in den jeweiligen Gruppen aufgrund des Eintretens von Abbruchkriterien (siehe III. 9.4.5) euthanasiert werden musste und daher die Messwerte vollständig entsprechend der Ausgangssituation generiert werden konnten.

Für die statistische Auswertung wurden bei jedem Therapieversuch die absoluten Volumenänderungen beider Therapiegruppen untereinander sowie die jeweiligen Therapiegruppen mit der Kontrollgruppe mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Tests für zwei unabhängige Stichproben im SPSS-Programm verglichen, wobei  $p < 0,05$  als signifikant und  $p < 0,01$  als hoch signifikant galt. Die Berechnung wurde zweiseitig durchgeführt.

#### **9.4.2 Überwachung des Körpergewichtes**

Die Bestimmung des Gewichtes in Gramm [g] wurde regulär bei jeder Maus zu denselben Zeitpunkten, an denen auch die Tumorvermessung erfolgte, vorgenommen. Die ermittelten Gewichte wurden in Microsoft Excel dokumentiert, sodass der Gewichtsverlauf jeder einzelnen Maus stets verfolgt werden konnte. Am Tag der Euthanasie wurden die Mäuse gewogen. Nach erfolgter Euthanasie wurden die Tumoren entnommen und das Gewicht der Tumoren in [g], ebenfalls auf eine Stelle hinter dem Komma genau, gesondert auf derselben Waage wie die Mäuse zuvor, ermittelt. Das generierte Gewicht der Tumoren wurde von dem ermittelten Gewicht der Mäuse subtrahiert und das Ergebnis anschließend mit dem Ausgangsgewicht zu Beginn des Versuches verglichen, um die tatsächliche prozentuale Körpergewichtsveränderung ohne das zusätzliche Tumorgewicht zu errechnen.

Für einen statistischen Vergleich zwischen den Therapiegruppen bzw. zwischen der Kontrollgruppe und der jeweiligen Therapiegruppe innerhalb eines Therapieversuches hinsichtlich ihrer Gewichtsänderung wurde die Differenz zwischen Endgewicht ohne Tumor und Ausgangsgewicht in [g] gebildet. Diese Differenz wurde mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben bewertet, wobei  $p < 0,05$  als signifikant und  $p < 0,01$  als hoch signifikant galten. Die Berechnung wurde zweiseitig durchgeführt. Die Auswertungen erfolgten im SPSS-Programm.

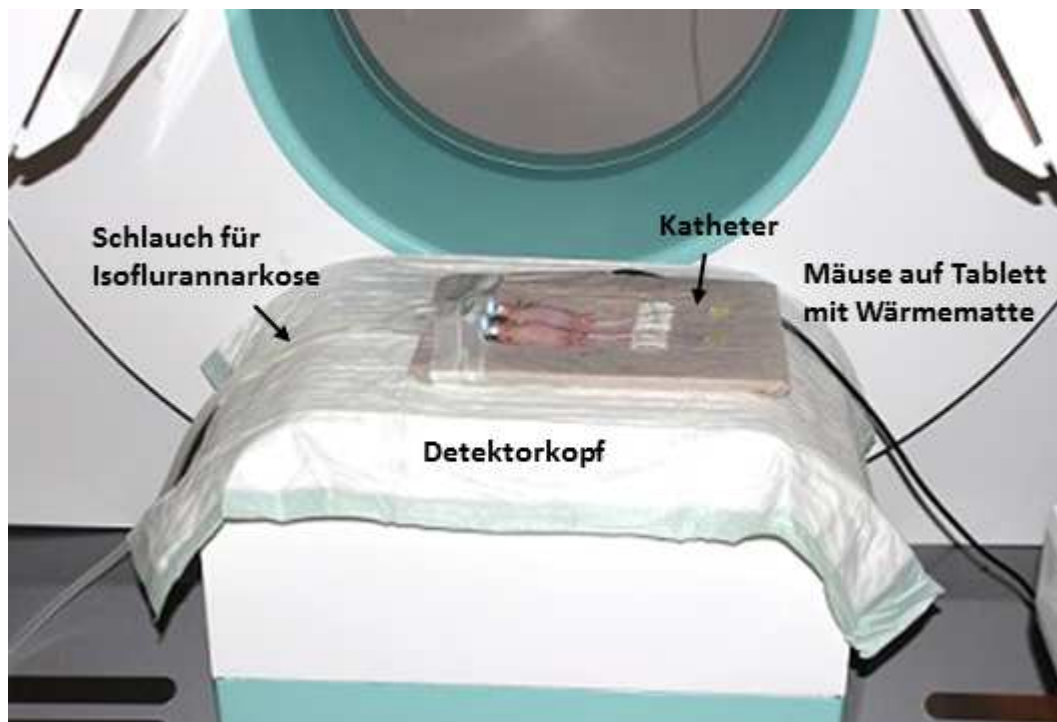
#### **9.4.3 $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie**

Zur Evaluierung einer möglichen Beeinträchtigung oder Schädigung der Nieren durch die Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurden an den therapierten Mäusen in Anlehnung an bereits veröffentlichte Studien dynamische, planare Nierenfunktionsszintigraphien mit  $^{99m}\text{Tc}$  markiertem Mercaptoacetyltriglycin (MAG<sub>3</sub>) unternommen (Roberts et al., 2007; Herrler et al., 2012; Ilhan, 2013). Es

erfolgte eine erste Messung vor der Therapie an den noch tumorfreien, gesunden Mäusen zur Erstellung einer Baseline hinsichtlich der individuellen Nierengesundheit. Die zweite Messung erfolgte nach der Therapie gegen Ende des jeweiligen Therapieversuchs an denselben Mäusen. Es wurden jeweils gleichviele Tiere aus beiden Therapiegruppen untersucht.

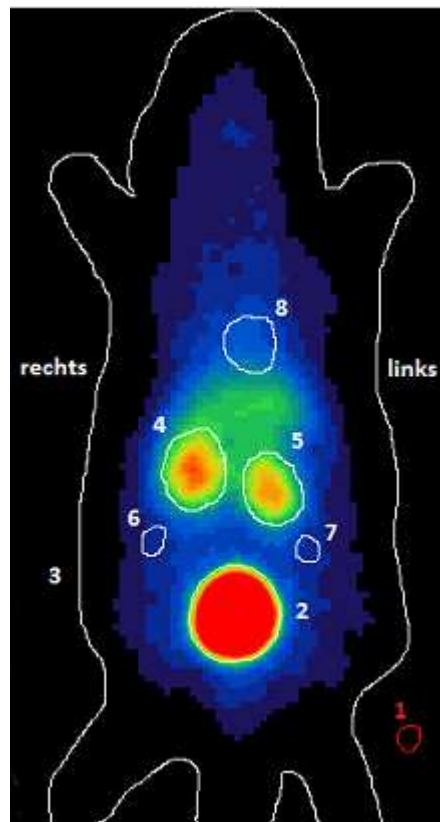
Die Mäuse wurden dazu vor den Messungen mit Isofluran in Narkose gelegt und auf einem mit einer Wärmematte präparierten Tablett paarweise gelagert. Anschließend wurden den jeweiligen beiden Mäusen Katheter in die laterale Schwanzvene gelegt. Für die folgende Ganzkörperaufnahme der Mäuse wurde das Tablett auf einem Kopf einer Drei-Kopf-y-Kamera (Philips-Prism 3000 XP) platziert. Mit dem Start der dynamischen Aufnahmen erhielt zunächst die vordere Maus eine Bolusinjektion von  $20 \pm 3$  MBq des  $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$  über den Schwanzkatheter. Der hinteren Maus wurde dasselbe im Abstand von 30 s injiziert (siehe Abbildung 6).

Die jeweiligen Messprotokolle wiesen eine Dauer von 15 min auf, die in 180 Frames mit je 5 s unterteilt waren. Zudem wurde eine Bildvergrößerung um den Faktor 4 festgelegt.



**Abbildung 6: Paarweise Platzierung der Mäuse auf einem Detektorkopf der Philips-Prism 3000 XP Drei-Kopf-y-Kamera**

Zur Auswertung der szintigraphisch erzeugten Bilder bzw. Daten wurde die Software Hermes Dynamic Study Display in der Version 4.0 (Hermes Gold V2.10, Hermes Medical Solutions, Stockholm/London) verwendet. Das Auswertungsverfahren fand ebenfalls in Anlehnung an die bereits erwähnten Studien von Herrler et al. (2012) und Ilhan (2013) statt. Diese Software ermöglichte es, mit einem standardisierten Verfahren sog. „regions of interest“ (ROIs) manuell um relevante Organe oder Strukturen zu legen und die darin enthaltene Count-Rate zu bestimmen. Besagte ROIs wurden bei jeder einzelnen Maus jeweils über den ganzen Körper, die Blase, die rechte und die linke Niere mit den jeweiligen perirenaln Hintergrund-Referenzregionen sowie um das Herz zur Generierung des Blutpoolsignals in einer Zeit-Aktivitäts-Kurve, gelegt. Die Injektionsstelle wurde wegen der Bildvergrößerung nicht auf dem Bild erfasst. Daher wurde diese ROI außerhalb des Körpers in eine Region ohne relevante Count-Zahl gelegt, sodass keine Verfälschung eintreten konnte (siehe Abbildung 7).



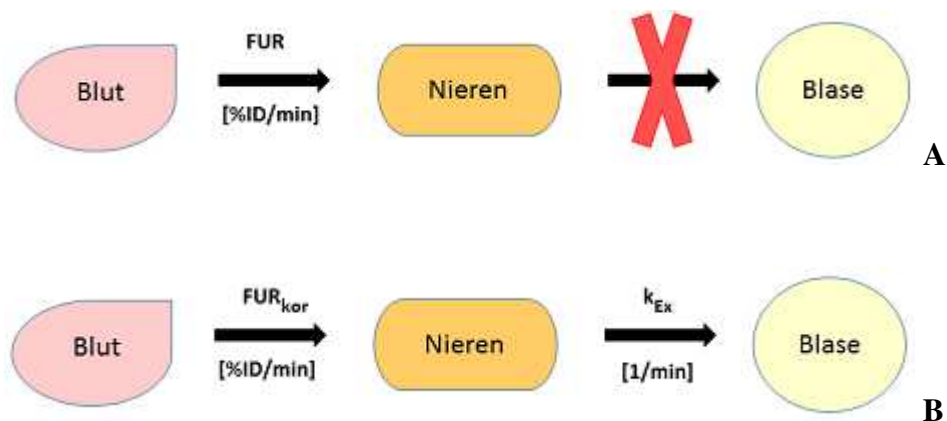
**Abbildung 7: Szintigraphische Aufnahme zur Überprüfung der Nierenfunktion einer mit  $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$  applizierten Maus**

Ansicht von ventral; eingezeichnete ROIs: Alternativ-ROI zur Injektionsstelle (1), Blase (2), Ganzkörper (3), rechte Niere (4), linke Niere (5), Hintergrund-ROIs zu den jeweiligen Nieren (6 und 7), Herz (8)

#### 9.4.3.1 Berechnung und Beurteilung der korrigierten Aufnahme- und der tubulären Exkretionsrate

Die sog. „fractional uptake rate“ (FUR) gibt eine Aussage über den Anteil des Tracers im Blut, der pro Zeit in die Niere gelangt. Der aufgenommene Teil hat die Einheit %ID. Daraus ergibt sich für die FUR die Einheit [%ID/min]. Sie stellt eine Methode dar, um in einem kinetischen Modell die Funktion eines Organs nachzustellen. Bei der FUR wird ein Zeitbereich von nur 25 s betrachtet und eine exkretorische Funktion wird nicht berücksichtigt. Die FUR wird mittels des sog. Rutland-Patlak-Plots dargestellt (Rutland et al., 2000).

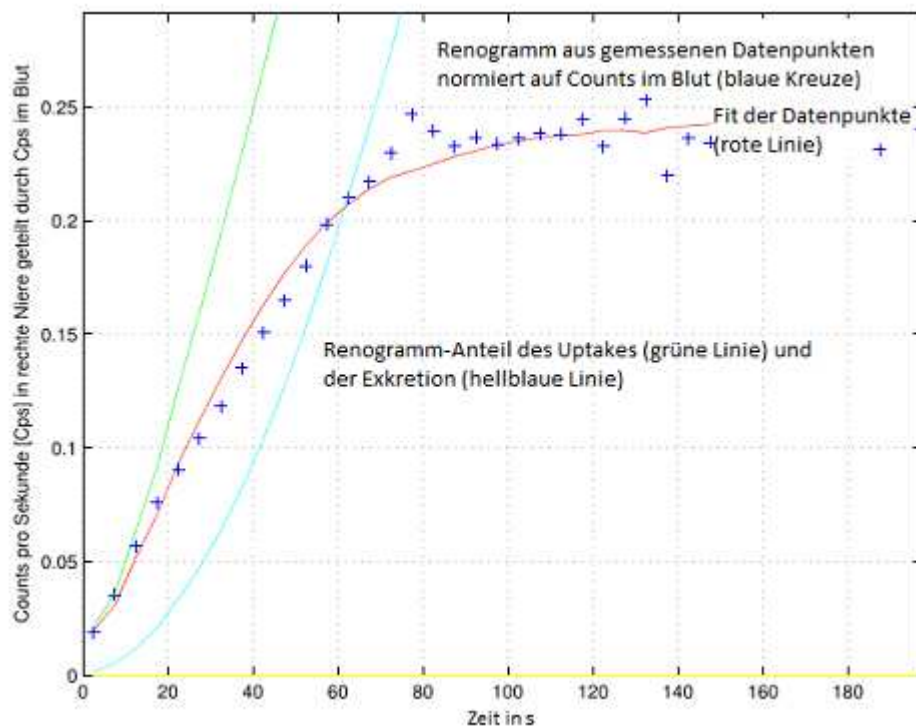
In Anlehnung an das Berechnungsmodell der FUR wurde ein Programm mit der Software von Matlab V. 2011 geschrieben, das sowohl eine korrigierte Aufnahme- ( $FUR_{kor}$ ) als auch die tubuläre Exkretionsrate ( $k_{Ex}$ ) berücksichtigt und einen Zeitbereich bis 200 s einbezieht (Vomacka, Zellmer, Abteilung für Physik der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums der Universität München). Die  $FUR_{kor}$  hat analog zur FUR die Einheit [%ID/min], die Exkretionsrate  $k_{Ex}$  die Einheit [1/min]. Abbildung 8 zeigt den Unterschied zwischen FUR und des hier verwendeten kinetischen Modells mit  $FUR_{kor}$  und  $k_{Ex}$ . Abbildung 9 zeigt die graphische Darstellung der Funktion mit der die Werte für  $FUR_{kor}$  und tubuläre Exkretionsrate errechnet wurden.



**Abbildung 8: Unterschied zwischen der Fractional Uptake Rate (Rutland-Patlak-Plot) und dem neuen kinetischen Modell mit der korrigierten Aufnahme- und der tubulären Exkretionsrate**

(A) Die Fractional Uptake Rate (FUR) geht davon aus, dass innerhalb einer „minimum transit time“ (MINTT) die Modellannahme gilt, dass der Tracer in der Niere verbleibt und keine Exkretion stattfindet (Rutland et al., 2000).

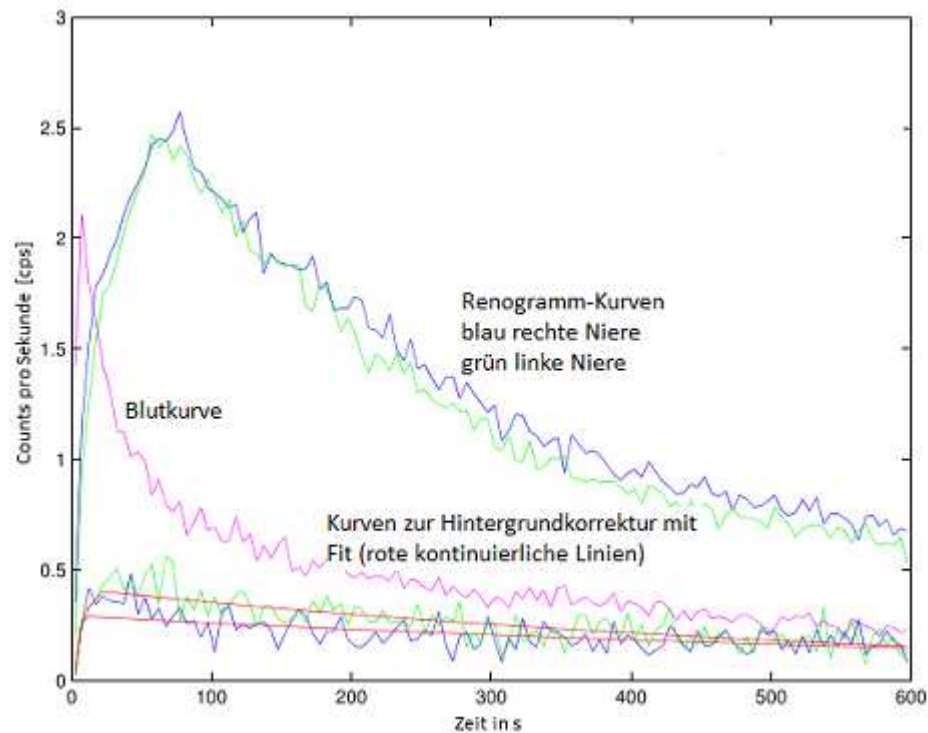
(B) In dem neuen Berechnungsmodell wurde mit der Einführung des zusätzlichen Parameters  $k_{Ex}$  die tubuläre Exkretion mit einbezogen. Daraus resultiert ein höherer Wert für die  $FUR_{kor}$  im Vergleich zur FUR, da aufgrund der Exkretion ein Nachfließen des Tracers in die Niere in der Berechnung berücksichtigt wird.



**Abbildung 9: Funktionen zur Generierung der Werte für die korrigierte Aufnahme rate und tubuläre Exkretions rate am Beispiel einer rechten Niere einer mit  $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$  applizierten Maus**

Die Werte für die korrigierte Aufnahme rate ( $\text{FUR}_{\text{kor}}$ ) und die tubuläre Exkretions rate ( $k_{\text{Ex}}$ ) werden über den Fit der Renogramm-Datenpunkte erstellt. Dieser Fit der Renogramm-Datenpunkte entsteht aus der Subtraktion der Funktion für die Exkretion von der Funktion des Uptake. Beim Fitten werden Parameter einer Modellfunktion an Datenpunkte angepasst; s: Sekunden

Die Counts für die Renogramm-Kurven wurden auf die Gesamt-Counts im Ganzkörper normiert und hintergrundkorrigiert. Die Hintergrundkorrektur erfüllt den Zweck, die Strahlung (gemessene Counts) des Gewebes um die Nieren, die in die tatsächlichen Nieren-Counts hineinwirkt, zu eliminieren. Für die Hintergrundkorrektur des Nierensignals mussten zunächst Counts in der Fläche der Hintergrund-ROI rechnerisch auf die Counts entsprechend der Größe der Nieren-ROI angepasst werden. Das monoexponential gefittete Hintergrundsignal wurde vom Nierensignal subtrahiert, um die tatsächlichen Counts in der Niere zu generieren (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Renogramm-Kurven und Fit der Hintergrundkorrektur für beide Nieren einer mit  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> applizierten Maus**

Renogramm-Kurven für rechte und linke Niere bzw. die dazugehörigen Hintergrundkorrekturen (grüne und blaue Linien) und monoexponentielle Fits zur Hintergrundkorrektur (rote kontinuierliche Linien); s: Sekunden

Für die  $FUR$ , die  $FUR_{kor}$  und die  $k_{Ex}$  wurde die Korrelation der Veränderung der Parameter zur erhaltenen therapeutischen Gesamtaktivität des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC bestimmt. Die Korrelationsberechnung nach Pearson wurde im SPSS-Programm berechnet, wobei  $p < 0,05$  als signifikant und  $p < 0,01$  als hochsignifikant galt.

Die statistische Bewertung zwischen der iRGD- und der NaCl-Therapiegruppe eines Therapieversuches erfolgte, indem die Veränderungen von  $FUR_{kor}$  und  $k_{Ex}$  der beiden Therapiegruppen eines Therapieversuches verglichen wurden. Dazu wurden in jedem Therapieversuch die Differenzen zwischen der Baseline- und der posttherapeutischen Messung für  $FUR_{kor}$  und  $k_{Ex}$  jeweils in der iRGD- und der NaCl-Therapiegruppe bestimmt. Die Differenzen der beiden Therapiegruppen eines Therapieversuches wurden über den nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Außerdem wurden die Veränderungen der Baseline- zu posttherapeutischen Messung für die  $FUR_{kor}$  und  $k_{Ex}$  innerhalb einer Therapiegruppe eines jeden Therapieversuchs mittels des nicht parametrischen Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben statistisch ausgewertet. Für beide Tests galten  $p < 0,05$  als signifikant

und  $p < 0,01$  als hoch signifikant. Die Berechnung wurde zweiseitig durchgeführt. Die Auswertungen erfolgten im SPSS-Programm.

#### **9.4.3.2 Erstellung und Beurteilung der Renogramm-Kurven**

Für die Erstellung einer Zeit-Aktivitäts-Kurve, den sog. Renogramm-Kurven, wurden die während der dynamischen Messung erzeugten Daten für jede einzelne Maus in Microsoft Excel übertragen. Die Renogramm-Kurven dienen der Darstellung der Nierenfunktion als Kurve im zeitlichen Verlauf. Dabei wurde der prozentuale Anteil der injizierten Aktivität „percentage of injected dose“ [%ID] gegen die Zeit aufgetragen. Die %ID für jeden 5 s dauernden Frame errechnete sich durch die Division der Count-Raten der hintergrundkorrigierten Nieren-ROI durch die um die Injektionsstelle korrigierte Ganzkörper-ROI. Für die Hintergrundkorrektur der Nieren-ROI wurde der unter III. 9.4.3.1 beschriebene gefittete Hintergrundwert verwendet. Die Steigung bzw. der Abfall der Kurve konnte zur Beurteilung der Nierenfunktion heran gezogen werden. Dabei bedeuteten eine steile Steigung und ein starker Kurvenabfall eine bessere Nierenfunktion. Als Zahlenwerte gaben die maximalen Countraten in den Nieren (Peak %ID) und die verstrichene Zeit in Sekunden [s]. bis zum Erreichen der maximalen Count-Rate (time to peak, TTP) interpretatorische Unterstützung.

Die statistische Bewertung der Daten zwischen der iRGD- und der NaCl-Therapiegruppe eines Therapieversuches erfolgte, indem die Veränderungen von Peak %ID und TTP der beiden Therapiegruppen eines Therapieversuches miteinander verglichen wurden. Dazu wurden in jedem Therapieversuch die Differenzen zwischen der Baseline- und der posttherapeutischen Messung für Peak %ID und TTP jeweils bei der iRGD- und der NaCl-Therapiegruppe bestimmt. Die Differenzen der beiden Therapiegruppen eines Therapieversuches wurden über den nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Außerdem wurden die Veränderungen der Baseline- zur posttherapeutischen Messung für den Peak %ID und TTP innerhalb einer Therapiegruppe eines jeden Therapieversuchs mittels des nicht parametrischen Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben statistisch ausgewertet. Für beide Tests galten  $p < 0,05$  als signifikant und  $p < 0,01$  als hoch signifikant. Die Berechnung wurde zweiseitig durchgeführt. Die Auswertungen erfolgten im SPSS-Programm.



#### 9.4.4 Finale Blutentnahme

Die finale intrakardiale Blutentnahme zur Gewinnung relevanter Parameter zur Bestimmung der toxischen Wirkung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC auf Nieren und Knochenmark wurde bei den therapierten Mäusen unter tiefer Isoflurannarkose vorgenommen. Die Mäuse wurden auf der rechten Seite gelagert. Für die Blutentnahme wurden 1-ml-Einmalspritzen und eine 27G-Kanüle verwendet. Die Stichrichtung zur Punktion des Herzens erfolgte auf Höhe des Ellbogengelenkes nach kranial zwischen zwei Rippen hindurch in den Thorax. Das Blut wurde durch vorsichtiges Aspirieren abgenommen und anschließend unverzüglich in ein Lithium-Heparin-Blut Röhrchen verbracht. Für die Bestimmung von Harnstoff, Kreatinin, Leukozyten und Thrombozyten wurden mindestens 300  $\mu\text{l}$  Blut benötigt. Als Referenzwerte wurden dieselben Blutparameter bei 15 gesunden, weiblichen 11 bis 15 Wochen alten SHO-Mäusen generiert. Sämtliche Blutparameter der Mäuse dieser Studie wurden von einem externen Labor der Laboklin GmbH & Co.KG, Bad Kissingen, Deutschland bestimmt. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Mäuse unter überdosierter Isoflurannarkose mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

Für die statistische Auswertung wurden in jedem Therapieversuch die Ergebnisse der untersuchten Blutparameter beider Therapiegruppen untereinander mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Tests für zwei unabhängige Stichproben im SPSS-Programm verglichen, wobei  $p < 0,05$  als signifikant und  $p < 0,01$  als hoch signifikant galten. Die Berechnung wurde zweiseitig durchgeführt.

#### 9.4.5 Abbruchkriterien

Die Mäuse wurden täglich sorgfältig in Augenschein genommen und hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens und ihrer körperlichen Konstitution beurteilt. Ein striktes Monitoring der Tumorgroße, des Gewichtes sowie eventueller Beeinträchtigung des Wohlbefindens ermöglichte ein sehr schnelles Eingreifen und Einleiten entsprechender Maßnahmen, falls nötig. Über eine Euthanasie wurde für jede Maus individuell, nach gründlichem Abwägen und unter Berücksichtigung der jeweiligen vorliegenden Situation und des Gesamtzustands des Tieres, entschieden.

Als Abbruchkriterien galten:

- gestörtes Allgemeinbefinden (u.a. gekrümmter Rücken, Haut- bzw. Schleimhautveränderungen, Apathie, Dehydratation)
- Gewichtsreduktion der Tiere im Versuchszeitraum > 10%
- Tumervolumina > 1500 mm<sup>3</sup> bzw. Tumoren mit > 10% des Körpergewichtes
- blutende und/oder nekrotisierende Tumoren
- Beeinträchtigungen der physiologischen Bewegung durch die Tumoren

Als Orientierungshilfe für die Abbruchkriterien dienten die „Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch“ des Ausschusses für Tierschutzbeauftragte der GV-SOLAS und des Arbeitskreises 4 der TVT (GV-SOLAS, 2009).

Der angesetzte Versuchszeitraum bei erfolgreicher Therapie und Nichteintreten der Abbruchkriterien wurde für den Therapieversuch mit einem Therapiezyklus auf 50 Tage und für Therapieversuche mit zwei Therapiezyklen auf 100 Tage begrenzt.

#### **9.4.6 Statistische Auswertung hinsichtlich des Überlebens**

Die Bewertung der Überlebensdaten der Mäuse gibt gleichermaßen Auskunft über das Eintreten der Abbruchkriterien, aufgrund derer die Tiere zu euthanasieren waren. Die Überlebenszeit wurde ab Therapiebeginn gewertet. Für die Auswertung und graphische Darstellung wurde die Kaplan-Meier-Überlebenskurve herangezogen. Die hierzu verwendeten statistischen Tests waren der Breslow-Test (Generalized Wilcoxon Test), der sich auf einen frühen Zeitpunkt im Diagramm konzentriert, der Log-Rank-Test für späte Zeitpunkte im Diagramm sowie der Tarone-Ware-Test, der seinen Beurteilungsschwerpunkt dazwischen hat. Als signifikant galt  $p < 0,05$ , und als hoch signifikant  $p < 0,01$ . Des Weiteren wurden die mittleren Überlebenszeiten seit Therapiebeginn mit Standardfehler (S.E.M.) berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte im SPSS-Programm.

## **9.5 Therapieversuche mit $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC an AR42J-tumortragenden Mäusen – Therapieversuche im Einzelnen**

### **9.5.1 Therapieversuch I mit einem Therapiezyklus**

In diesem ersten Therapieversuch wurden 33 weibliche, 12 Wochen alte SHO-Mäuse randomisiert in zwei Therapiegruppen mit jeweils 13 Tieren und eine Kontrollgruppe mit 7 Tieren aufgeteilt. Die Anzahl der Mäuse in der iRGD-Therapiegruppe reduzierte sich nach einer festgestellten Nierenanomalie auf 12 Tiere. Die Therapie fand am Tag 7 nach erfolgter subkutaner Zellinjektion statt.

#### **9.5.1.1 $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und iRGD-Regime**

Das  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurden mit einer zu verabreichenden Aktivitätshöhe von  $25 \pm 5$  MBq angesetzt und wurde in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  appliziert. Die Koinjektionen von iRGD oder entsprechend alternativ der NaCl-Lösung erfolgten in diesem ersten Therapieversuch einen Tag vor der Therapie, 1 Stunde vor der Therapie sowie am darauffolgenden Tag.

#### **9.5.1.2 Überwachung des Tumorumfanges**

Die Bestimmung des Tumorumfanges und das Vorgehen zur Auswertung der Daten erfolgten bei allen Mäusen wie unter III. 9.4.1 beschrieben.

#### **9.5.1.3 Überwachung des Körpergewichtes**

Die Gewichtsbestimmung und das Vorgehen zur Auswertung der Daten erfolgten bei allen Mäusen wie unter III. 9.4.2 beschrieben.

#### **9.5.1.4 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie**

Je Therapiegruppe durchliefen 6 Mäuse jeweils eine Baseline-Messung und einen Post-Therapie-Scan. Die Durchführung der Nierenszintigraphien und das Vorgehen zur Auswertung der Daten sind unter III. 9.4.3 detailliert beschrieben.

#### **9.5.1.5 Finale Blutentnahme**

Die Blutentnahme und die Bestimmung der Blutparameter erfolgten wie unter III. 9.4.4 erklärt.

#### **9.5.1.6 Überleben**

Die Auswertung der Überlebensdaten erfolgte wie unter III. 9.4.6 beschrieben.

### **9.5.2 Therapieversuch II mit zwei Therapiezyklen**

In diesem zweiten Therapieversuch mit zweimaliger therapeutischer Verabreichung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC standen 35 weibliche, 12 Wochen alte SHO-Mäuse zur Verfügung, die randomisiert auf zwei Therapiegruppen mit jeweils 14 Tieren und einer Kontrollgruppe mit 7 Tieren verteilt wurden. Nach der Baseline-Messung der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie reduzierte sich die Tierzahl in der iRGD-Therapiegruppe auf 13 Tiere. Die Therapie fand am Tag 7 nach erfolgter subkutaner Zellinjektion statt.

#### **9.5.2.1 $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und iRGD-Regime**

Der zweite Therapieversuch enthielt zwei Therapiezyklen im Abstand von 8 Tagen. Das  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC je Therapiezyklus wurden mit einer zu verabreichenden Aktivitätshöhe von  $50 \pm 5$  MBq angesetzt und in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  appliziert. Die Koinjektionen von iRGD bzw. NaCl-Lösung erfolgten analog zu Therapieversuch I (siehe III. 9.5.1).

#### **9.5.2.2 Überwachung des Tumorumfanges**

Die Bestimmung des Tumorumfanges und das Vorgehen zur Auswertung der Daten erfolgten bei allen Mäusen wie unter III. 9.4.1 beschrieben.

#### **9.5.2.3 Überwachung des Körpergewichtes**

Die Gewichtsbestimmung und das Vorgehen zur Auswertung der Daten erfolgten bei allen Mäusen wie unter III. 9.4.2 beschrieben.

#### **9.5.2.4 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie**

Alle Mäuse einer jeden Therapiegruppe durchliefen jeweils eine Baseline-Messung sowie einen Post-Therapie-Scan. Die Durchführung der Nierenszintigraphien und das Vorgehen zur Auswertung der Daten sind unter III. 9.4.3 detailliert beschrieben.

#### **9.5.2.5 Finale Blutentnahme**

Die Blutabnahme und die Bestimmung der Blutparameter erfolgten wie unter III. 9.4.4 erklärt.

#### **9.5.2.6 Überleben**

Die statistische Berechnung der Überlebensdaten erfolgte wie unter III. 9.4.6 beschrieben.

### **9.5.3 Therapieversuch III mit zwei Therapiezyklen und modifiziertem iRGD-Regime**

Im letzten Therapieversuch wurden 38 weibliche 9 Wochen alte SHO-Mäuse randomisiert in zwei Therapiegruppen mit jeweils 15 Tieren und eine Kontrollgruppe mit 8 Tieren aufgeteilt. In beiden Therapiegruppen wurde jeweils eine Maus aufgrund anderweitiger organischer Erkrankungen von den Therapieversuchen ausgeschlossen und somit nicht in die Auswertung mit einbezogen, sodass beide Therapiegruppen nur noch 14 Mäuse zählten. Die Therapie fand am Tag 6 nach erfolgter subkutaner Zellinjektion statt.

#### **9.5.3.1 $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und iRGD-Regime**

Wie im vorangegangenen zweiten Therapieversuch wurden auch hier zwei Therapiezyklen mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in einer Höhe von jeweils  $50 \pm 5$  MBq mit einem Applikationsabstand von 8 Tagen vorgenommen. In diesem Therapiezyklus wurde das Vorgehen bei der Verabreichung der Koinjektionen von iRGD bzw. der NaCl-Lösung in den beiden Therapiegruppen modifiziert. Die Dosierung des iRGD von 200  $\mu\text{g}$  in 100  $\mu\text{l}$  isotonischer NaCl-Lösung (8  $\mu\text{mol/kg}$ ) je Injektion sowie alternativ 100  $\mu\text{l}$  NaCl-Lösung wurden beibehalten. Anders als in den vorangegangenen Versuchen wurden neben der intraperitonealen Verabreichung zusätzlich noch subkutane Injektionen im Bereich des Tumors für den Zeitraum einer Halbwertszeit des  $^{177}\text{Lu}$  vorgenommen. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten nach demselben System wie auch die Therapietiere, subkutane Injektionen mit der NaCl-Lösung um den Tumor herum, um dort den selben mechanischen Reiz zu setzen. An den Tagen -1, und +1, bzw. +7 und +9 erfolgten die intraperitonealen Injektionen jeweils in der Früh, die subkutanen Injektionen nachmittags. An den Therapietagen (Tag 0 und Tag 8) wurden die Koinjektionen i. p. jeweils 1 Stunde vor der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC-Applikation verabreicht, s. c. jeweils parallel dazu. An den anderen Tagen mit alleiniger subkutaner Injektion wurde diese jeweils vormittags vorgenommen. An den dazwischen liegenden Wochenenden wurde mit den subkutanen Injektionen pausiert (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Applikationsschema der Koinjektion mit iRGD und NaCl-Lösung bei den Mäusen der beiden Therapiegruppen**

Tag 0 = Therapietag 1. Zyklus, Tag -1 = Tag vor Therapie, Tag +1 = Tag nach Therapie, usw., Tag + 7 = Tag -1 für 2. Zyklus, Tag 8 = Therapietag 2. Zyklus; die Therapietage sind fett gedruckt; NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), i. p.: intraperitoneal, s. c.: subkutan

Zyklus 1	Therapiegruppe (NaCl)		Therapiegruppe (iRGD)	
	i. p.	s. c.	i. p.	s. c.
Tag -1	x	x	x	x
<b>Tag 0</b>	x	x	x	x
Tag +1	x	x	x	x
Tag +2		x		x
Tag +5		x		x
Tag +6		x		x
Zyklus 2	Therapiegruppe (NaCl)		Therapiegruppe (iRGD)	
	i. p.	s. c.	i. p.	s. c.
Tag +7	x	x	x	x
<b>Tag +8</b>	x	x	x	x
Tag +9	x	x	x	x
Tag +12		x		x
Tag +13		x		x
Tag +14		x		x

### 9.5.3.2 Überwachung des Tumolvolumens

Die Bestimmung des Tumolvolumens und das Vorgehen zur Auswertung der Daten erfolgten bei allen Mäusen wie unter III. 9.4.1 beschrieben.

### 9.5.3.3 Überwachung des Körpergewichtes

Die Gewichtsbestimmung und das Vorgehen zur Auswertung der Daten erfolgten bei allen Mäusen wie unter III. 9.4.2 beschrieben.

### 9.5.3.4 <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie

Die Mäuse einer jeden Therapiegruppe (je n = 14) erhielten jeweils eine Baseline-Messung sowie einen Post-Therapie-Scan. Die Durchführung der Nierenszintigraphien und das Vorgehen zur Auswertung der Daten sind unter III. 9.4.3 detailliert beschrieben.

### 9.5.3.5 Finale Blutentnahme

Die Blutentnahme und die Bestimmung der Blutparameter geschahen wie unter III. 9.4.4 erklärt.

### **9.5.3.6 Anfertigen von Blutaussstrichen**

Von den therapierten Mäusen des dritten Therapieversuches wurden, vor der intrakardialen Blutabnahme zusätzlich Blutaussstriche für ein Differentialblutbild angefertigt. Hierbei wurden prozentuale Angaben zum Vorkommen von Lymphozyten, segmentkernigen und stabkernigen neutrophilen Leukozyten, eosinophilen und basophilen Leukozyten sowie Monozyten erbracht. Den Mäusen wurde dazu, ebenfalls unter Isoflurannarkose, die laterale Schwanzvene punktiert und ein Tropfen Blut auf einen Objektträger verbracht. Der Ausstrich erfolgte nach gängiger Methodik. Diesbezügliche Referenzwerte wurden von 10 der unter III. 9.4.4 erwähnten Referenzmäuse ermittelt. Die Ergebnisse zu den Blutaussstrichen wurden von dem bereits genannten externen Labor (Laboklin GmbH) angefertigt.

### **9.5.3.7 Überleben**

Die statistische Berechnung der Überlebensdaten erfolgte wie unter III. 9.4.6 beschrieben.

### **9.5.3.8 Präparation der Nieren für die histologische Untersuchung**

Eine zusätzliche histologische Untersuchung beider Nieren über eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte bei den Mäusen aus dem dritten Therapieversuch. Die Nieren wurden dazu am Versuchsende sofort nach der Euthanasie entnommen, in 10%igem, neutral gepuffertem Formalin fixiert, längs halbiert und im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München routinemäßig entwässert und in Paraffin eingebettet. Schnitte mit einer Dicke von 2 µm wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histologisch beurteilt. Bei 26 therapierten Mäusen war mindestens eine Niere histologisch auswertbar, wobei 11 Tiere aus der NaCl-Therapiegruppe und 13 Tiere aus der iRGD-Therapiegruppe in die endgültige Auswertung mit einbezogen wurden. Des Weiteren erfolgte eine histologische Beurteilung von beiden Nieren von 3 unbehandelten Referenztieren aus der Gruppe, aus der auch die Referenzwerte für die Blutparameter generiert wurden.

Alle Nieren wurden von zwei unabhängigen Pathologen (geblindet für die Therapiegruppen) untersucht.

Zur Beurteilung der histopathologischen Befunde wurde ein semiquantitatives Scoringssystem angewendet mit folgenden Kriterien (siehe Tabelle 6):

**Tabelle 6: Semiquantitatives Scoringssystem zur Beurteilung der histopathologischen Nierenbefunde im Therapieversuch III**

Score		0	1	2	3
Glomerula	mesangiale Ödematisierung/ Hyalinablagerung	nicht vorhanden (Normalbefund)	gering- gradiges Ödem	mittel- gradiges Ödem	geringgradige Hyalinablage- rung
	Verlust des Bowmanschen Kapselraums	nicht vorhanden (Normalbefund)	Kapselraum- lumen geringgradig verringert	Kapselraum- lumen mittelgradig verringert	Kapselraum- lumen verlegt
	Podozyten- /Parietalzell- hypertrophie und - hyperplasie	nicht vorhanden (Normalbefund)	sehr vereinzelt	vereinzelt	multifokal
proximale Tubuli	Vakuolisierung	nicht vorhanden (Normalbefund)	geringgradig, vereinzelt	mittelgradig, mäßig häufig	hochgradig, häufig
	Degeneration	nicht vorhanden (Normalbefund)	geringgradig, vereinzelt	mittelgradig, mäßig häufig	hochgradig, häufig
	tubuläre Dilatation	nicht vorhanden (Normalbefund)	geringgradig, vereinzelt	mittelgradig, mäßig häufig	hochgradig, häufig
	intraluminale hyaline Akkumulationen	nicht vorhanden (Normalbefund)	geringgradig, vereinzelt	mittelgradig, mäßig häufig	hochgradig, häufig
	intrazyto- plasmatische Granula	nicht vorhanden (Normalbefund)	wenige Granula in wenigen Tubulus- epithelzellen nachweisbar	mittelgradig Granula in einigen Tubulus- epithelzellen nachweisbar	zahlreiche Granula in zahlreichen Tubulus- epithelzellen nachweisbar
distale Tubuli	tubuläre Dilatation	nicht vorhanden (Normalbefund)	geringgradig, vereinzelt	mittelgradig, mäßig häufig	hochgradig, häufig
	Degeneration	nicht vorhanden (Normalbefund)	geringgradig, vereinzelt	mittelgradig, mäßig häufig	hochgradig, häufig
Inter- stitium	Entzündungszell- infiltration	nicht vorhanden (Normalbefund)	geringgradig, vereinzelt	mittelgradig, mäßig häufig	hochgradig, häufig



## IV. ERGEBNISSE

### 1. Manifestation und Erscheinungsbild der subkutanen Tumoren

#### 1.1 Zelllinie AR42J

Durch die subkutane Injektion von  $5 \times 10^6$  Zellen an der rechten Flanke konnte ein Wachsen der Tumoren bei 100 % der Mäuse erzielt werden. Davon zeigten 95 % der Tumoren innerhalb von 7 Tagen einen messbaren Durchmesser von 2 bis 3 mm. Die Tumoren kennzeichneten sich durch ein sehr schnelles Wachstum und eine ausgeprägte Neoangiogenese aus und stellten sich dementsprechend als sehr blutreich dar (siehe Abbildung 11 A und B). Bei größeren Tumoren waren nekrotische Bereiche im Tumorrinneren deutlich erkennbar.

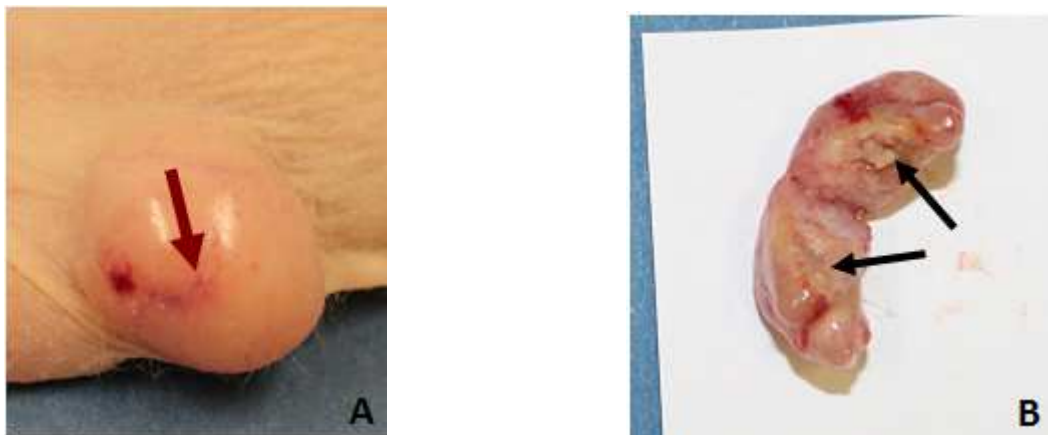


**Abbildung 11: Maus mit blutreichem AR42J-Flankentumor**

(A) dunkelrote Färbung verrät hohen Blutreichtum; (B) deutlich erkennbare Gefäßversorgung (schwarzer Pfeil)

## 1.2 Zelllinie NCI-H69

Durch die subkutane Injektion von  $7,5 \times 10^6$  NCI-H69-Zellen an die rechte Flanke konnte bei 70 % der Tiere ein Tumorwachstum erreicht werden. Die Tumoren zeichneten sich durch ein sehr langsames und ungleichmäßiges Wachstum mit nur sehr geringer Neoangiogenese und geringer Durchblutung aus (siehe Abbildung 12A). Auf ein erkennbares Tumorwachstum bei den ersten Tieren musste 3 Wochen gewartet werden. Bei größeren Tumoren waren deutliche Nekrosen im Tumorrinneren erkennbar (siehe Abbildung 12 B). Eine zu beobachtende Besonderheit stellte sich bei 4 injizierten Mäusen dar, die anstelle eines Flankentumors massive Lungentumoren entwickelten.

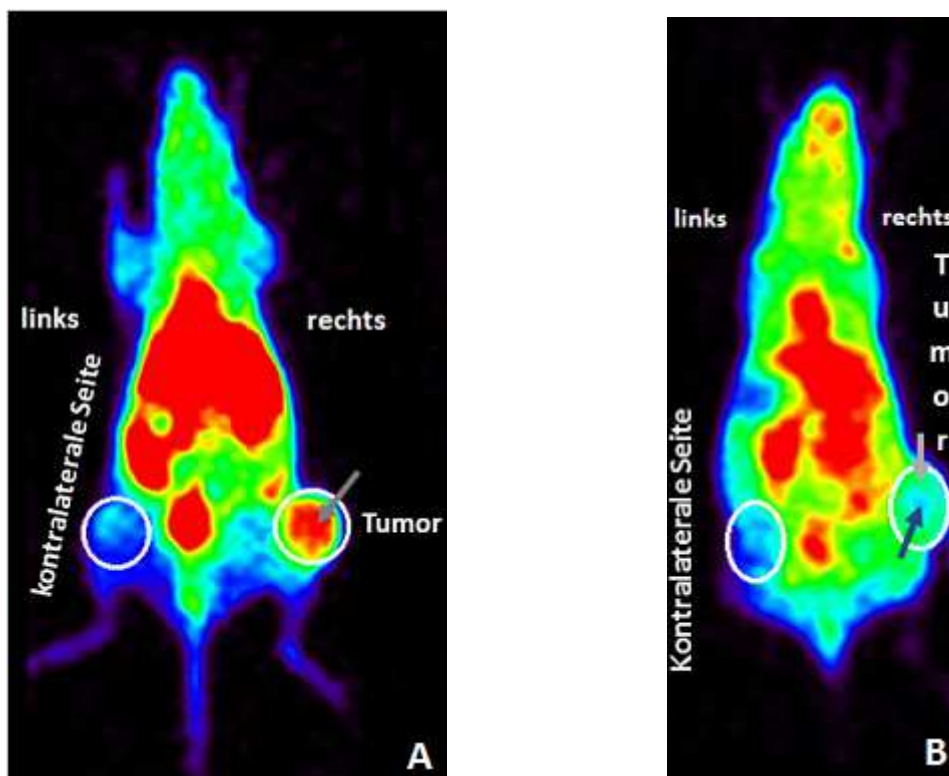


**Abbildung 12: NCI-H69-Flankentumoren**

(A) Maus mit NCI-H69-Flankentumor mit geringer Gefäßversorgung (brauner Pfeil); (B) entfernter NCI-H69-Flankentumor, aufgeschnitten; deutlich sichtbare nekrotische Bereiche im Inneren des Tumors (schwarze Pfeile)

## 2. $\mu$ PET-Messungen mit $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD zur Darstellung der $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine

Die exemplarischen  $\mu$ PET-Messungen von 5 tumortragenden Mäusen je Zelllinie (AR42J und NCI-H69) mit  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD ergaben für die Aktivitätsanreicherung im Tumor im Vergleich zur kontralateralen Seite ein Aktivitätsverhältnis  $3,2 \pm 1,5$  bei den AR42J-Tumoren. Die vermehrte Anreicherung des Tracers ist im Bereich der AR42J-Tumoren in den  $\mu$ PET-Aufnahmen deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 13 A). Die NCI-H69-Tumoren wiesen eine, wenn auch eine geringere, Mehranreicherung im Bereich der Tumoren in einem Aktivitätsverhältnis von  $2,3 \pm 1,1$  auf (siehe Abbildung 13 B).



**Abbildung 13:  $\mu$ PET-Aufnahmen mit  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD an tumortragenden Mäusen**

(A) Maus mit einem subkutanen AR42J-Tumor (weißer Kreis, rechte Seite) und kontralateralem Äquivalent (weißer Kreis, linke Seite); vermehrte Anreicherung des Tracers (grauer Pfeil bzw. roter Bereich im Tumor); (B) Maus mit einem subkutanen NCI-H69-Tumor (weißer Kreis, rechte Seite) mit kontralateralem Äquivalent (weißer Kreis, linke Seite); Anreicherung des Tracers (grauer Pfeil bzw. grüner Bereich im Tumor), vermutlich nekrotischer Bereich (dunkelblauer Pfeil)

### **3. Aktivitätsanreicherung in Nieren und Tumoren**

#### **3.1 Biodistribution und Dosimetrie an NCI-H69-tumortragenden Mäusen**

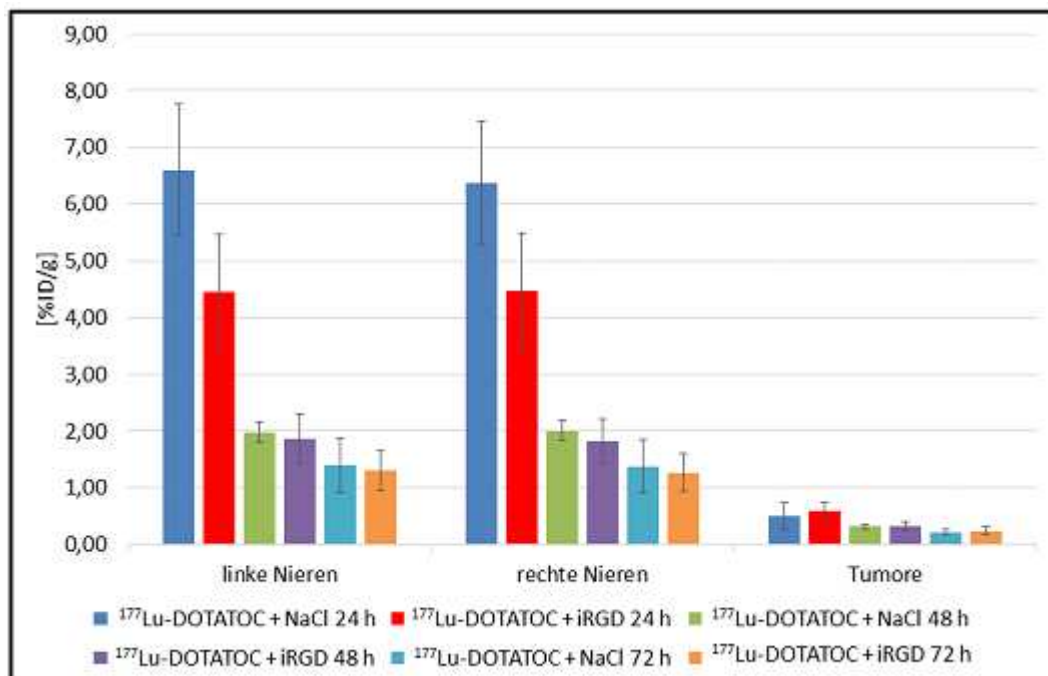
##### **3.1.1 Biodistribution**

Die Nieren wiesen die höchste Aktivitätsanreicherung auf mit jedoch starker Aktivitätsabnahme vom Zeitpunkt 24 h auf 48 h nach Injektion des Radiopharmakons (siehe Tabelle 7). Die Werte für die linken und rechten Nieren wiesen mit jeweils  $p = 0,083$  keinen signifikanten Unterschied zwischen der NaCl- und der iRGD-Gruppe auf. Eine Tendenz zugunsten der iRGD-Gruppe zum Zeitpunkt 24 h ließ sich bei den Nieren trotz einer hohen Streuung der Werte erkennen. Die Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe verzeichnete zu jedem Zeitpunkt eine sehr geringe Aufnahme des Radiopharmakons mit relativ hoher Streuung der Werte (siehe Tabelle 7). Blut und Muskulatur wiesen zu keinem Zeitpunkt eine nennenswerte Aktivitätsanreicherung auf. Die Muskulatur diente dabei als Referenzwert für die Anreicherung in neutralem Gewebe. Das Tumor-Muskel-Verhältnis verdeutlicht die Mehranreicherung im Tumor verglichen mit neutralem Gewebe (siehe Tabelle 7). In den Abbildungen 14, 15 und 16 stellen Balken- und Liniendiagramme die Werte aus Tabelle 7 für Nieren und Tumoren graphisch dar. Es konnte zu keinem Zeitpunkt für keinen Wert ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 7: Mittelwerte mit Standardabweichung für Nieren und NCI-H69-Tumoren in [%ID/g] und Tumor-Muskel-Verhältnis bei Mäusen**

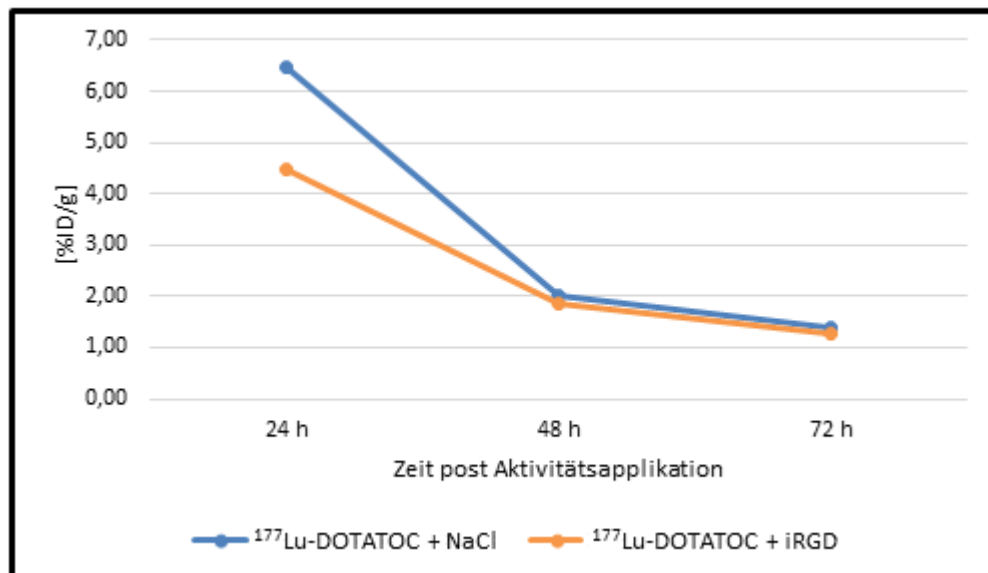
Zum Zeitpunkt 24 h post Injektion konnten aus beiden Gruppen nur jeweils 4 Mäuse aufgrund pathologisch veränderter linker Nieren mit in die Berechnung des Mittelwertes einbezogen werden, sonst n = 5 je Gruppe und Zeitpunkt; MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, h: Stunden, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe

Zeitpunkt post Injektion und jeweilige Gruppe	MW ± SD [%ID/g]				Tumor-Muskel- Verhältnis
	linke Nieren	rechte Nieren	beide Nieren	Tumoren	
<b>24 h post</b>					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	6,597	6,373	6,485	0,497	30
SD	1,157	1,083	1,044	0,233	21
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	4,457	4,465	4,461	0,597	56
SD	1,011	1,019	0,940	0,132	14
<b>48 h post</b>					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	1,986	2,004	1,995	0,318	53
SD	0,171	0,183	0,167	0,044	24
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	1,873	1,820	1,847	0,324	39
SD	0,436	0,383	0,388	0,069	14
<b>72 h post</b>					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	1,398	1,376	1,387	0,216	34
SD	0,475	0,469	0,445	0,044	11
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	1,301	1,268	1,284	0,245	39
SD	0,351	0,336	0,324	0,071	6



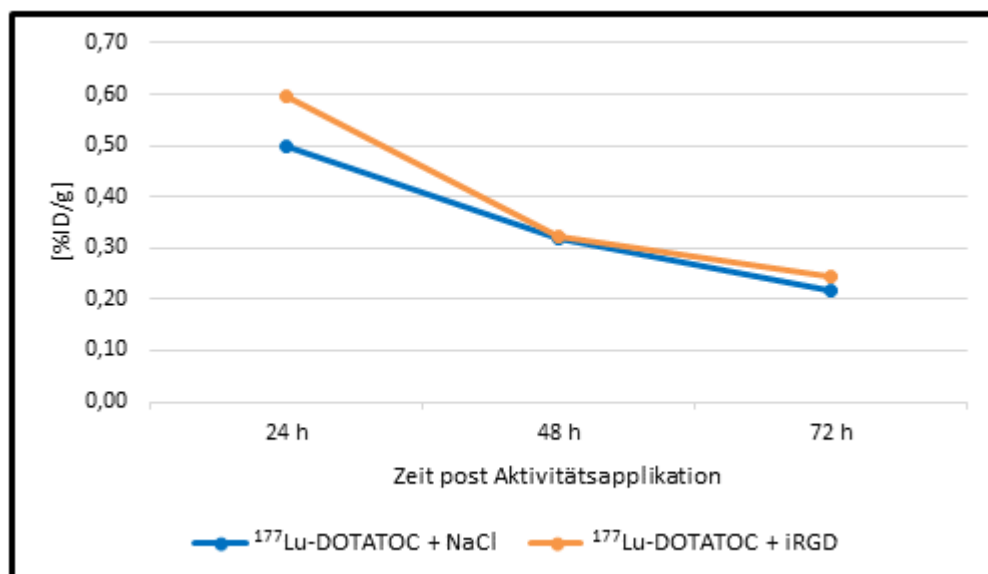
**Abbildung 14: Balkendiagramm zur Aktivitätsanreicherung in linken und rechten Nieren sowie in den NCI-H69-Tumoren bei Mäusen**

Balkendiagramme erstellt gemäß Angaben aus Tabelle 7 entsprechend der Mittelwerte inklusive Standardabweichungen in [%ID/g]; h: Stunden, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe



**Abbildung 15: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in beiden Nieren bei NCI-H69-tumortragenden Mäusen**

Kurven erstellt gemäß Angaben aus Tabelle 7 entsprechend der Mittelwerte in [%ID/g]; die Standardabweichungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet; h: Stunden, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe



**Abbildung 16: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in den NCI-H69-Tumoren bei Mäusen**

Kurven erstellt gemäß Angaben aus Tabelle 7 entsprechend der Mittelwerte in [%ID/g]; die Standardabweichungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet; h: Stunden, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe

### 3.1.2 Dosimetrie

Die Ergebnisse zur Berechnung der relativen Dosis [Gy/MBq] für Nieren und Tumoren sowie die prozentualen Unterschiede für diese Werte, im Vergleich der Mäuse mit Koinjektion von NaCl-Lösung bzw. iRGD, sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Die berechneten Dosiswerte zeigen tendenzielle Abweichungen zugunsten der iRGD-Gruppe, sowohl für die Nieren als auch für die Tumoren.

**Tabelle 8: Relative Dosiswerte für NCI-H69-Tumoren und Nieren bei Mäusen sowie prozentualer Vergleich der Werte zwischen den Gruppen, bezogen auf die Gruppe mit iRGD als Koinjektion**

Dosisangaben in [Gy/MBq]; Gy: Gray; MBq: Megabequerel, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Relative Dosis [Gy/MBq]		Differenz in % iRGD vs. NaCl
	<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	
Tumoren	0,0374	0,0390	4,19
Nieren	0,1435	0,1143	-20,35



### 3.2 Biodistribution und Dosimetrie an AR42J-tumortragenden Mäusen

#### 3.2.1 Biodistribution

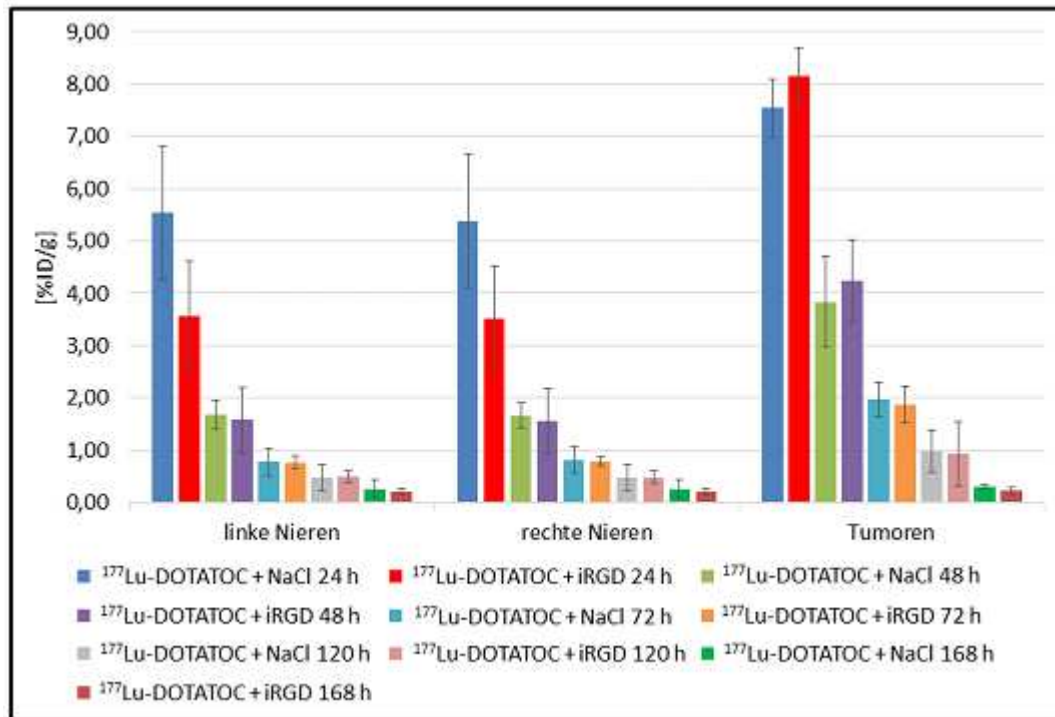
Die Biodistribution an fünf Zeitpunkten für Nieren und AR42J-Tumoren ergab eine höhere Anreicherung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im Tumor als in den Nieren mit einem deutlichen Abfall der Aktivität von 24 h auf 48 h. Zwischen den Gruppen konnte ein Anreicherungsverhalten für Nieren und Tumoren tendenziell zugunsten der iRGD-Gruppe beobachtet werden. Es lag eine hohe Streuung der einzelnen Werte vor. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte für Nieren und Tumoren nicht festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). Das Tumor-Muskel-Verhältnis war mit  $p = 0,050$  bei 24 h in der iRGD-Gruppe signifikant höher. In Tabelle 9 sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der Mäuse zu den jeweiligen Zeitpunkten angegeben. Die Abbildungen 17, 18 und 19 zeigen die zugehörigen Balken- und Liniendiagramme.

**Tabelle 9: Mittelwerte mit Standardabweichung für Nieren und AR42J-Tumoren in [%ID/g] und Tumor-Muskel-Verhältnis bei Mäusen**

n = 4 Mäuse je Gruppe und Zeitpunkt; MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung; h: Stunden; NaCl: Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe

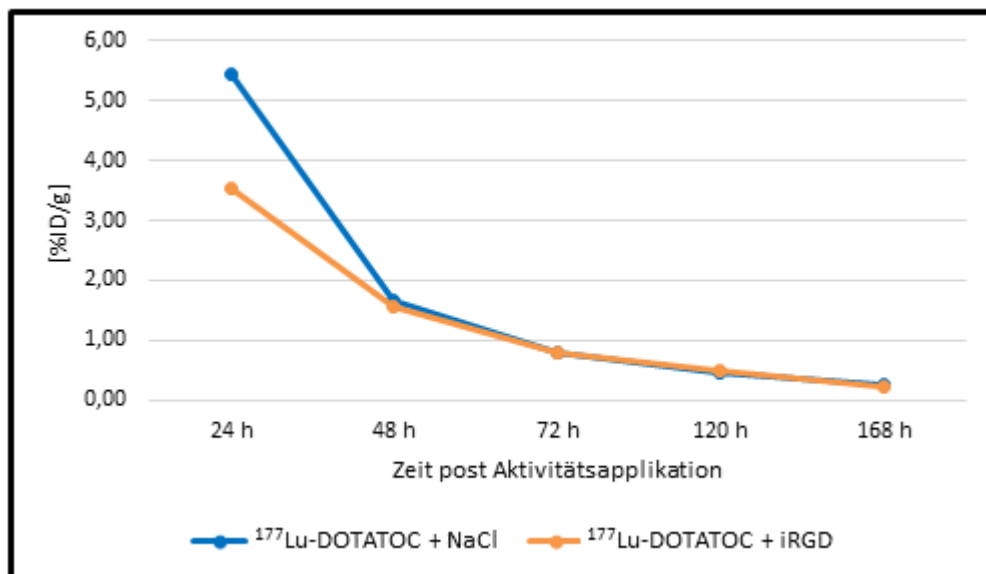
Zeitpunkt post Injektion und jeweilige Gruppe	MW ± SD [%ID/g]				Tumor-Muskel-
	linke Nieren	rechte Nieren	beide Nieren	Tumoren	Verhältnis
24 h post					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	5,543	5,378	5,461	7,540	367
SD	1,282	1,278	1,149	0,555	140
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	3,554	3,511	3,532	8,158	731
SD	1,073	0,996	0,926	0,535	247
48 h post					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	1,673	1,658	1,666	3,841	472
SD	0,281	0,242	0,243	0,861	49
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	1,574	1,563	1,568	4,246	683
SD	0,633	0,608	0,575	0,779	267
72 h post					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	0,781	0,816	0,799	1,975	401
SD	0,263	0,257	0,233	0,332	49
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	0,768	0,792	0,780	1,880	433
SD	0,116	0,082	0,091	0,346	84
120 h post					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	0,462	0,474	0,468	0,988	329
SD	0,253	0,250	0,233	0,399	231
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	0,501	0,483	0,492	0,926	194
SD	0,116	0,120	0,110	0,616	143
168 h post					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	0,265	0,266	0,266	0,307	111
SD	0,174	0,170	0,154	0,043	27
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	0,205	0,202	0,204	0,236	221
SD	0,065	0,066	0,061	0,058	178





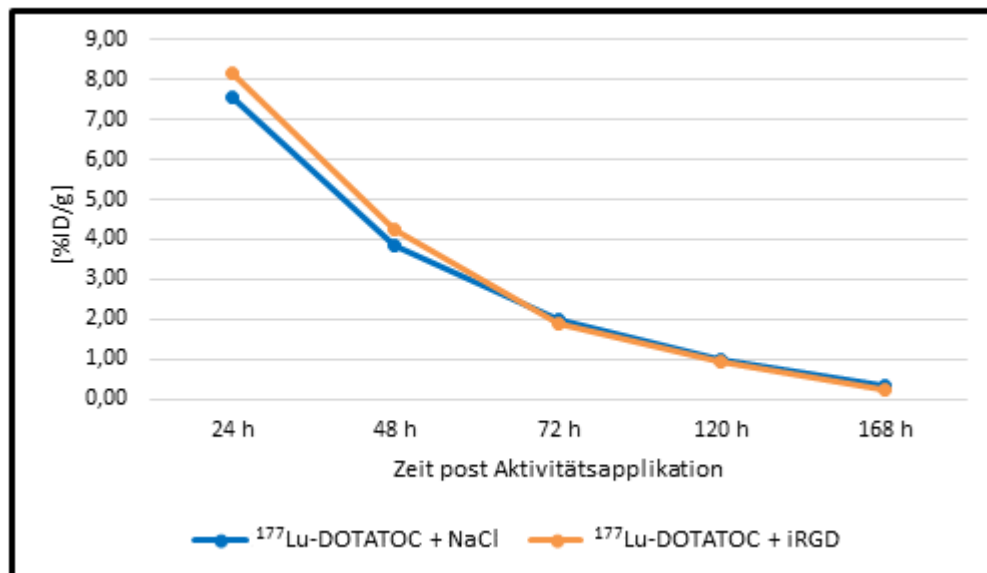
**Abbildung 17: Balkendiagramm zur Aktivitätsanreicherung in linken und rechten Nieren sowie in den AR42J-Tumoren bei Mäusen**

Balkendiagramme erstellt gemäß Angaben aus Tabelle 9 entsprechend der Mittelwerte inklusive Standardabweichungen in [%ID/g]; h: Stunden, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe



**Abbildung 18: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in beiden Nieren bei AR42J-tumortragenden Mäusen**

Kurven erstellt gemäß Angaben aus Tabelle 9 entsprechend der Mittelwerte in [%ID/g]; die Standardabweichungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet; h: Stunden, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe



**Abbildung 19: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in den AR42J-Tumoren bei Mäusen**

Kurven erstellt gemäß Angaben aus Tabelle 9 entsprechend der Mittelwerte in [%ID/g]; die Standardabweichungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet; h: Stunden, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID/g]: Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe

### 3.2.2 Dosimetrie

Die Ergebnisse zur Berechnung der relativen Dosis [Gy/MBq] für Nieren und Tumoren sowie die prozentualen Unterschiede für diese Werte, im Vergleich der Mäuse mit Koinjektion von NaCl-Lösung bzw. iRGD, sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Die berechneten Dosiswerte zeigen tendenzielle Abweichungen zugunsten der iRGD-Gruppe, sowohl für die Nieren als auch für die Tumoren.

**Tabelle 10: Relative Dosiswerte von AR42J-Tumoren und Nieren bei Mäusen sowie prozentualer Vergleich der Werte zwischen den Gruppen, bezogen auf die Gruppe mit iRGD als Koinjektion**

Dosisangaben in [Gy/MBq]; Gy: Gray; MBq: Megabequerel, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Relative Dosis [Gy/MBq]		Differenz in % iRGD vs. NaCl
	$^{177}\text{Lu-DOTATOC} + \text{NaCl}$	$^{177}\text{Lu-DOTATOC} + \text{iRGD}$	
Tumoren	0,4126	0,4552	10,30
Nieren	0,0948	0,0910	-3,95

## **4. Therapieversuche mit $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC an Mäusen mit AR42J-Flankentumoren**

### **4.1 Therapieversuch I mit einem Therapiezyklus**

#### **4.1.1 Effektiv erhaltenes $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC**

Die Mäuse beider Therapiegruppen erhielten effektiv  $25 \pm 5$  MBq des therapeutisch wirksamen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

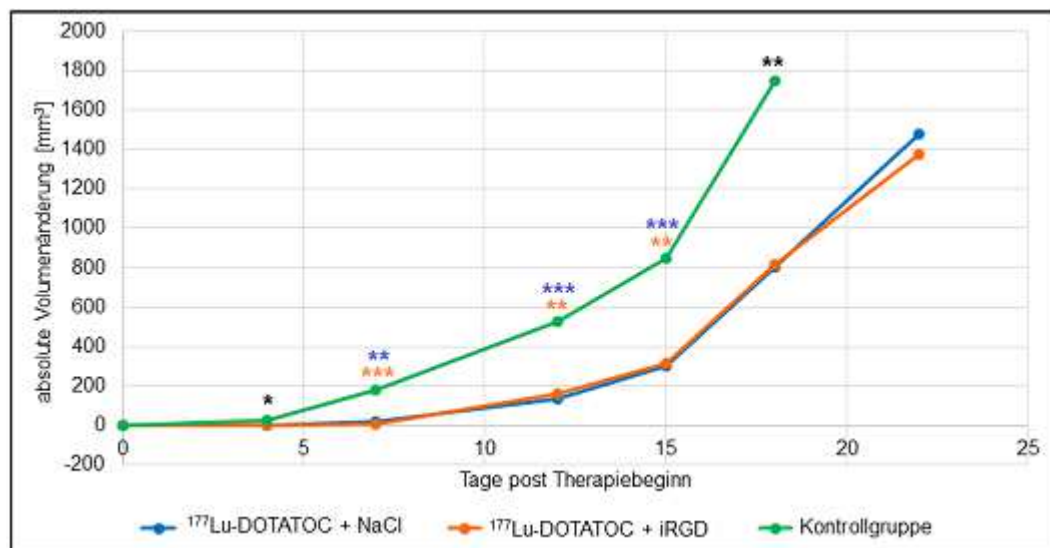
#### **4.1.2 Tumorzvolumen und absolute Volumenänderung**

Das Tumorzvolumen betrug bei den Mäusen zum Zeitpunkt des Therapiebeginns im Mittel  $40 \pm 20$  mm<sup>3</sup>. Bei 4 Mäusen in der NaCl-Therapiegruppe und bei einer Maus in der Kontrollgruppe waren solide Tumoren sichtbar, allerdings war das Volumen nicht eindeutig zu bestimmen. Diesen Tumoren war ein Anfangsvolumen von 0 mm<sup>3</sup> zugeteilt. Die absoluten Volumenänderungen wurden bis Tag 22 in den Therapiegruppen und bis Tag 18 in der Kontrollgruppe bewertet. Die Mittelwerte inkl. der Standardabweichung der absoluten Volumenänderungen können der Tabelle 11 entnommen werden. Die Abbildung 20 zeigt hierzu die entsprechenden Kurven. Die Werte der beiden Therapiegruppen ähneln sich, wobei sie in beiden Gruppen eine große Streuung aufweisen. Ebenso zeigen die Werte in der Kontrollgruppe eine große Streuung. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Therapiegruppen konnte an keinem Tag festgestellt werden ( $p \geq 0,284$ ). Durch die Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC konnte in beiden Therapiegruppen eine Verzögerung für das Einsetzen des Tumorzwachstums von 7 bis 8 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden. Zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe war für Tag 4 ein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p < 0,05$ ), für die Tage 7 bis 18 ein hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ), wobei sich an den Tagen 12 und 15 der Unterschied zur NaCl-Therapiegruppe und an Tag 7 zur iRGD-Therapiegruppe mit  $p \leq 0,001$  als höchst signifikant darstellte.

**Tabelle 11: Absolute Volumenänderung der Tumoren der verschiedenen Gruppen je Messzeitpunkt im Therapieversuch I**

Therapietag ist fett gedruckt (Tag 0); n: Anzahl der Tiere, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

absolute Volumenänderung [mm <sup>3</sup> ] (Mittelwerte und Standardabweichungen)						
Tage post Therapie	<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 13)		<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)		Kontrollgruppe (n = 7)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
4	1,22	11,71	-0,49	12,38	26,85	28,59
7	20,56	24,30	8,38	19,43	178,36	150,05
12	131,83	91,64	160,13	102,93	526,76	270,43
15	304,13	175,25	313,10	231,32	849,47	320,06
18	801,34	385,08	814,44	411,87	1747,07	524,04
22	1474,85	711,28	1376,16	650,20	–	–



**Abbildung 20: Absolute Volumenänderung der Tumoren im Therapieversuch I bis Tag 22 in den Therapiegruppen und bis Tag 18 in der Kontrollgruppe**

Kurven erstellt gemäß der Mittelwerte aus Tabelle 11. Die eingezeichneten Sternchen stehen für signifikante Unterschiede bezüglich der absoluten Volumenänderung in [mm<sup>3</sup>] und bedeuten \*  $p < 0,05$  (signifikant), \*\*  $p < 0,01$  (hoch signifikant), \*\*\*  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant); Sternchen in schwarz: beide Therapiegruppen vs. Kontrollgruppe, Sternchen farbig: jeweilige Therapiegruppe vs. Kontrollgruppe; NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

### 4.1.3 Körpergewicht

Die Mäuse zeigten in allen Gruppen einen ähnlichen Gewichtsverlauf. Nach Abzug des Tumorgewichtes vom Lebendgewicht am Todestag verzeichneten, im Vergleich zum Ausgangsgewicht, in der NaCl-Therapiegruppe 85 % (n = 11/13) der Mäuse eine prozentuale Gewichtszunahme und 15 % eine Gewichtsreduktion. In der iRGD-Therapiegruppe zeigten 92 % (n = 11/12) eine prozentuale Gewichtszunahme. Eine Gewichtsreduktion wies nur eine Maus auf. In der Kontrollgruppe hatten 71 % (n = 5/7) einen Gewichtszuwachs und 29 % einen Gewichtsverlust. Eine Reduktion des Körpergewichtes von > 10 % gab es bei keiner Maus. Die Gewichtsänderungen vom Ausgangsgewicht zum tatsächlichen Endgewicht zwischen den beiden Therapiegruppen bzw. zwischen der jeweiligen Therapiegruppe und der Kontrollgruppe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ( $p \geq 0,479$ ). Tabelle 12 zeigt die Mittelwerte diverser Gewichtsparameter.

**Tabelle 12: Verschiedene Gewichtsparameter der Mäuse im Therapieversuch I**

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung in Gramm [g]; n: Anzahl der Tiere, NaCl: Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Ausgangsgewicht	Lebendgewicht Euthanasietag	Tumorgewicht	Tatsächliches Endgewicht
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 13)	23,7 ± 1,8	26,4 ± 2,1	2,0 ± 0,4	24,3 ± 2,1
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)	23,1 ± 1,3	25,8 ± 1,4	2,0 ± 0,5	23,8 ± 1,5
Kontrollgruppe (n = 7)	23,0 ± 2,2	25,4 ± 1,9	2,2 ± 0,1	23,3 ± 1,9

#### **4.1.4 $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie**

##### **4.1.4.1 Korrelation der FUR, FUR<sub>kor</sub> und k<sub>Ex</sub> mit der verabreichten Aktivität**

Mit  $p = 0,023$  wurde eine signifikante Korrelation zwischen erhaltener Therapieaktivitätshöhe und der Veränderung in der FUR festgestellt. Mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit von uns generierten Berechnungsmodell konnte sowohl für FUR<sub>kor</sub> als auch für k<sub>Ex</sub> mit  $p = 0,000$  für beide Variablen diesbezüglich eine höchst signifikante Korrelation ermittelt werden. Diese Feststellung gilt für alle drei Therapieversuche.

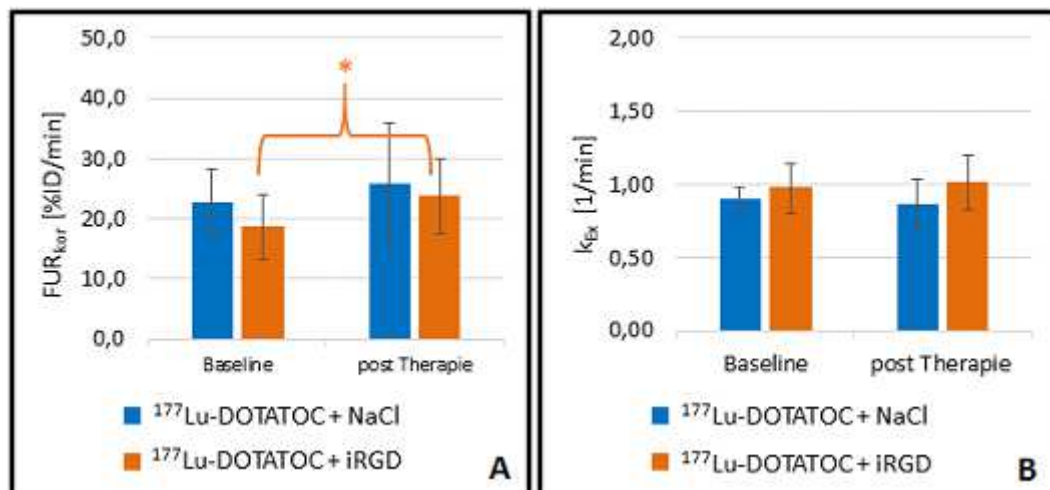
##### **4.1.4.2 Korrigierte Aufnahmerate und tubuläre Exkretionsrate**

Tendenziell wiesen die Nieren der Mäuse der NaCl-Therapiegruppe bereits bei der Baseline-Messung eine höhere korrigierte Aufnahmerate (FUR<sub>kor</sub>) auf als in der iRGD-Therapiegruppe (siehe Tabelle 13 und Abbildung 21 A). In der NaCl-Therapiegruppe steigerte sich die FUR<sub>kor</sub> tendenziell bei der posttherapeutischen Messung, allerdings nicht signifikant ( $p = 0,878$ ). In der iRGD-Therapiegruppe wies die FUR<sub>kor</sub> mit  $p = 0,050$  sogar noch eine signifikante Erhöhung bei der Messung nach der erfolgten Therapie auf. Die Werte für die Exkretionsrate (k<sub>Ex</sub>) waren dagegen in der iRGD-Therapiegruppe bereits bei der Baseline-Messung tendenziell höher als in der NaCl-Therapiegruppe und stiegen bei den posttherapeutischen Messungen zudem noch geringfügig an, allerdings nicht in signifikantem Maße ( $p = 0,778$ ). Dagegen verringerte sich die Exkretionsrate in der NaCl-Therapiegruppe im Allgemeinen geringfügig, jedoch ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,414$ ) (siehe Tabelle 13 und Abbildung 21 B). Beide Therapiegruppen zeigten im Vergleich untereinander bezüglich ihrer Veränderungen von der Baseline- zur posttherapeutischen Messung hinsichtlich der FUR<sub>kor</sub> mit  $p = 0,689$  und der Exkretionsrate mit  $p = 0,154$  kein signifikant unterschiedliches Verhalten.

**Tabelle 13: Mittelwerte mit Standardabweichung zur korrigierten Aufnahme- und zur tubulären Exkretionsrate im Therapieversuch I**

Je höher die Zahl, umso besser die  $FUR_{kor}$  (korrigierte Aufnahme- und zur tubulären Exkretionsrate in [%ID/min]) bzw. Exkretion ( $k_{Ex}$ : tubuläre Exkretionsrate in [1/min]); negative Vorzeichen bedeuten eine Reduktion der Funktion.  $FUR$ -Werte in [%ID/min] zum Vergleich: NaCl-Therapiegruppe:  $14,2 \pm 3,9$  (Baseline);  $14,0 \pm 5,4$  (post Therapie);  $-0,1 \pm 0,1$  (Differenz); iRGD-Therapiegruppe:  $9,9 \pm 3,1$  (Baseline);  $13,6 \pm 3,1$  (post Therapie),  $3,7 \pm 4,0$  (Differenz); n: Anzahl der Tiere,  $FUR_{kor}$ : korrigierte Aufnahme- und zur tubulären Exkretionsrate, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), %ID: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

Therapiegruppen	Baseline		post Therapie		Differenz post - Base	
	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl (n = 5)	$22,7 \pm 5,5$	$0,89 \pm 0,09$	$25,7 \pm 10,2$	$0,86 \pm 0,17$	$3,0 \pm 12,8$	$-0,03 \pm 0,17$
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD (n = 4)	$18,7 \pm 5,3$	$0,97 \pm 0,17$	$23,8 \pm 6,2$	$1,01 \pm 0,19$	$5,1 \pm 6,1$	$0,04 \pm 0,14$



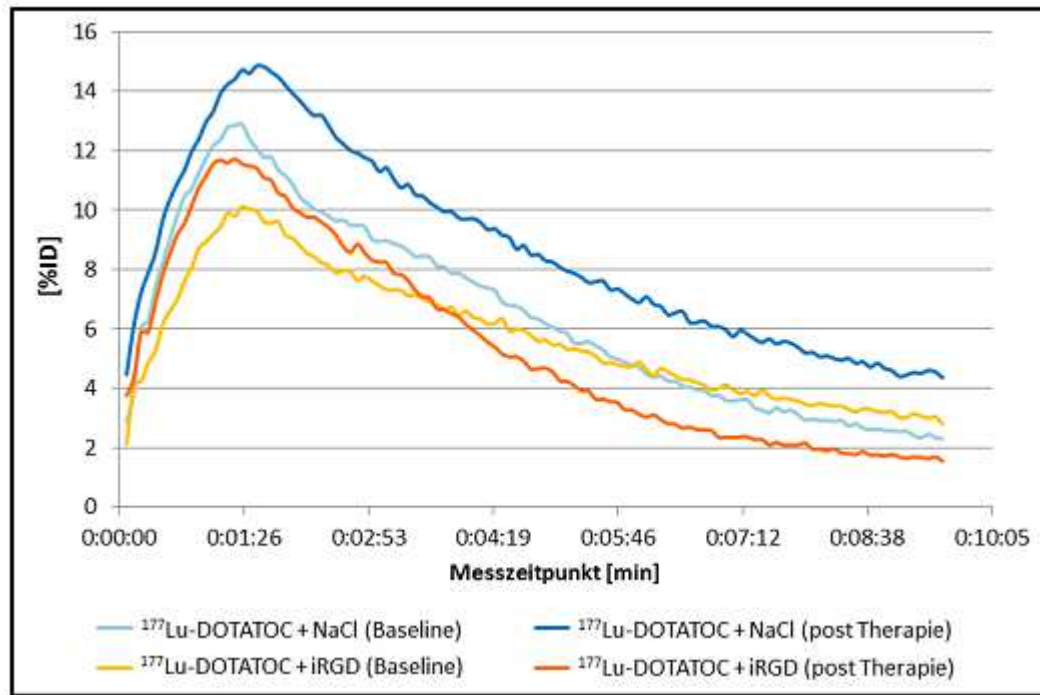
**Abbildung 21: Gegenüberstellung der korrigierten Aufnahme- und tubulären Exkretionsrate (B) der beiden Therapiegruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt im Therapieversuch I**

Mittelwerte und Standardabweichungen entsprechen den Zahlenwerten aus Tabelle 13. Ein signifikanter Unterschied wies nur der Vergleich Baseline vs. post Therapie in der iRGD-Therapiegruppe mit einer höheren korrigierten Aufnahme- und zur tubulären Exkretionsrate ( $FUR_{kor}$ ) auf (\*  $p = 0,050$ , signifikant);  $k_{Ex}$ : tubuläre Exkretionsrate, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), %ID: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

#### 4.1.4.3 Renogramm-Kurven

Die Renogramm-Kurven der Mäuse (siehe Abbildung 22) zeigen in der NaCl-Therapiegruppe sowohl bei der Baseline-Messung als auch bei der posttherapeutischen Messung eine steile Anflutungsphase und einen hohen Peak. Der Peak der posttherapeutischen Messung ist höher als der der Baseline-Messung. Der Abfall der Kurven stellt sich für beide Messzeitpunkte relativ flach dar, wobei die Kurve der posttherapeutischen Messung noch weiter abflacht. Die Anflutungsphase der iRGD-Therapiegruppe bei der Baseline-Messung verläuft weniger steil als die bei der posttherapeutischen Messung. Auch der Peak %ID ist in Hinblick auf die posttherapeutische Messung höher als bei der Baseline-Messung und nähert sich dem Niveau des Peak %ID des Baseline-Wertes der NaCl-Therapiegruppe an. Die TTP stellt sich verlängerte in der NaCl-Therapiegruppe dar, wohingegen sich diese in der iRGD-Therapiegruppe verkürzt (siehe Tabelle 14). Der Kurvenabfall bei den posttherapeutischen Messungen in der iRGD-Therapiegruppe ist deutlich steiler als der der Baseline-Messung und fällt sogar unter das Niveau der Baseline-Messung der NaCl-Therapiegruppe. Die Therapiegruppen zeigten im Vergleich untereinander keine signifikant unterschiedlichen Veränderungen für den Peak %ID ( $p = 0,964$ ). Für die TTP wurden signifikant unterschiedliche Veränderungen festgestellt ( $p = 0,014$ ). Innerhalb der Therapiegruppen waren die Werte für Peak %ID und die TTP im Vergleich zwischen Baseline- und posttherapeutischer Messung nicht signifikant unterschiedlich (Peak %ID  $p \geq 0,182$ ; TTP  $p \geq 0,084$ ).





**Abbildung 22: Renogramm-Kurven aus den Daten von Baseline- und posttherapeutischen Nierenszintigraphien der Mäuse beider Therapiegruppen im Therapieversuch I**

Die jeweiligen Renogramm-Kurven wurden aus Mittelwerten der Messdaten der Baseline- und posttherapeutischen Messungen von  $n = 5$  Mäusen in der Therapiegruppe  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl und  $n = 4$  Mäusen in der Therapiegruppe  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD generiert. Die Standardabweichungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet; NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID]: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

**Tabelle 14: Zahlenwerte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen) für Peak %ID und TTP zu den Renogramm-Kurven im Therapieversuch I**

$n$ : Anzahl der Tiere, TTP: Time to Peak, s: Sekunde, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

Therapiegruppen	Mittelwerte und Standardabweichung beider Nieren			
	Peak %ID		TTP [s]	
	Baseline	post Therapie	Baseline	post Therapie
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl ( $n = 5$ )	$13,3 \pm 3,2$	$15,4 \pm 5,1$	$79 \pm 6$	$92 \pm 16$
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD ( $n = 4$ )	$10,4 \pm 2,2$	$12,4 \pm 3,2$	$91 \pm 14$	$76 \pm 15$

#### 4.1.5 Blutparameter

Im Allgemeinen wiesen die Mäuse beider Therapiegruppen im Hinblick auf die Blutparameter ähnliche Werte auf. Bei Harnstoff und Leukozyten befand sich der Großteil der Werte im Referenzbereich. Kreatinin lag bei nahezu allen Mäusen deutlich außerhalb des Referenzbereiches. Bei den Thrombozytenwerten verteilte sich die Anzahl der Mäuse in der NaCl-Therapiegruppe innerhalb und unterhalb des Referenzbereiches zu fast gleichen Teilen. In der iRGD-Therapiegruppe verschob sich hier das Verhältnis zugunsten der Tiere, deren Werte Referenzbereich lagen. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Blutwerte zwischen beiden Therapiegruppen konnte nicht festgestellt werden ( $p \geq 0,440$ ). Tabelle 15 zeigt die gemessenen Wertebereiche im Detail mit zusätzlichen Angaben, wie viel Prozent der Mäuse (inkl. entsprechender Anzahl der Mäuse) der jeweiligen Therapiegruppe sich im Referenzbereich befanden bzw. wie viele Mäuse Werte darunter bzw. darüber aufwiesen.

**Tabelle 15: Blutwerte der therapierten Mäuse im Therapieversuch I inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe**

n: Anzahl der Tiere, Ref.be.: Referenzbereich, l: Liter, G: Giga, mmol: Millimol,  $\mu$ mol: Micromol, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Harnstoff [mmol/l]	Kreatinin [ $\mu$ mol/l]	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]
<b>Referenzbereich (n = 15)</b>	<b>5,8–9,8</b>	<b>12–24</b>	<b>0,9–2,1</b>	<b>439–999</b>
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + NaCl (n = 12)</b>				
absolute Werte	5,2–9,8	41–76	0,9–3,5	170–1014
% im Ref.be.	67 (n = 8)	–	75 (n = 9)	42 (n = 5)
% unter Ref.be.	33 (n = 4)	–	–	50 (n = 6)
% über Ref.be.	–	100 (n = 12)	25 (n = 3)	8 (n = 1)
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)</b>				
		<b>(n = 11)</b>	<b>(n = 8)</b>	
absolute Werte	5,2–9,0	13–70	1,0–3,1	140–1130
% im Ref.be.	67 (n = 8)	18 (n = 2)	87,5 (n = 7)	62,5 (n = 5)
% unter Ref.be.	33 (n = 4)	–	–	25 (n = 2)
% über Ref.be.	–	82 (n = 9)	12,5 (n = 1)	12,5 (n = 1)

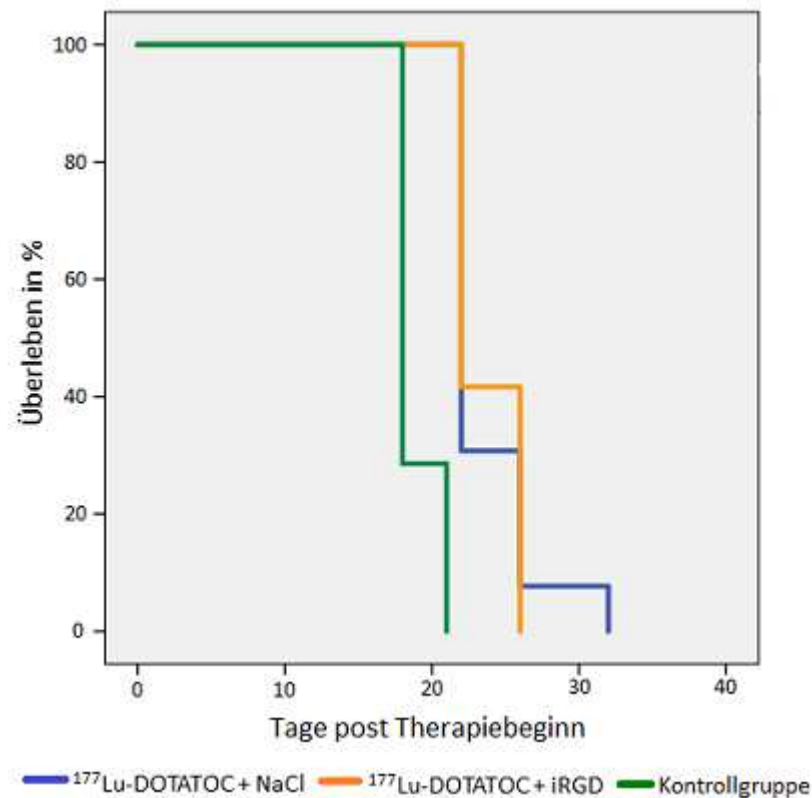
#### 4.1.6 Auswertung der Überlebensdaten

Alle Mäuse in diesem Versuch waren am Tag der Euthanasie bei gutem Allgemeinbefinden. Sie wurden ausschließlich aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien bezüglich des Tumors euthanasiert. In der NaCl-Therapiegruppe wiesen die Mäuse demnach eine mittlere Überlebenszeit von  $23,7 \pm 0,8$  Tagen auf, in der iRGD-Therapiegruppe von  $23,7 \pm 0,6$  Tagen und in der Kontrollgruppe von  $18,9 \pm 0,6$  Tagen. Tabelle 16 gibt eine Übersicht über die Anzahl der euthanasierten Mäuse sowie den prozentualen Anteil der überlebenden Mäuse in den jeweiligen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen konnte diesbezüglich mit keinem der angewendeten Signifikanztests festgestellt werden ( $p \geq 0,698$ ). Die Abbruchkriterien traten bei den Mäuse in beiden Therapiegruppen höchst signifikant später ein als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,000$  für alle drei Signifikanztests). Das entsprechende Kaplan-Meier-Diagramm zeigt Abbildung 23.

**Tabelle 16: Anzahl euthanasierter Mäuse und prozentualer Anteil der überlebenden Mäuse je Gruppe und Zeitpunkt im Therapieversuch I**

Die Euthanasie erfolgte aufgrund des Eintretens der Abbruchkriterien bezüglich der Tumoren; prozentualer Anteil bestimmt ausgehend von 100 % am Tag 0; n: Anzahl der Tiere, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

Tage post Therapiebeginn (Tag 0)	18	21	22	26	32
<b>Anzahl euthanasierter Mäuse</b>					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 13)	0	0	9	3	1
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)	0	0	7	5	–
Kontrollgruppe (n = 7)	5	2	–	–	–
<b>überlebende Mäuse in %</b>					
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	100	100	31	8	0
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	100	100	42	0	–
Kontrollgruppe	29	0	–	–	–



**Abbildung 23: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Mäuse der jeweiligen Gruppen im Therapieversuch I**

Ausgangstierzahl je Gruppe:  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl:  $n = 13$ ,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD:  $n = 12$ , Kontrollgruppe:  $n = 7$ . Deutlich zu erkennen ist der ähnliche bzw. teilweise identische Verlauf der Kurven beider Therapiegruppen (blaue und orange Linie) und der unterschiedliche Verlauf zwischen Kontrollgruppe (grüne Linie) und den Therapiegruppen; Therapiegruppen vs. Kontrollgruppe: Breslow-Test (Generalized Wilcoxon), Tarone-Ware-Test und Log-Rank-Test höchst signifikant ( $p = 0,000$ ); Therapiegruppen im Vergleich untereinander nicht signifikant unterschiedlich; n: Anzahl der Tiere, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

## 4.2 Therapieversuch II mit zwei Therapiezyklen

### 4.2.1 Effektiv erhaltenes $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC

Die Mäuse beider Therapiegruppen erhielten je Therapiezyklus effektiv  $53 \pm 5 \text{ MBq}$  des therapeutisch wirksamen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

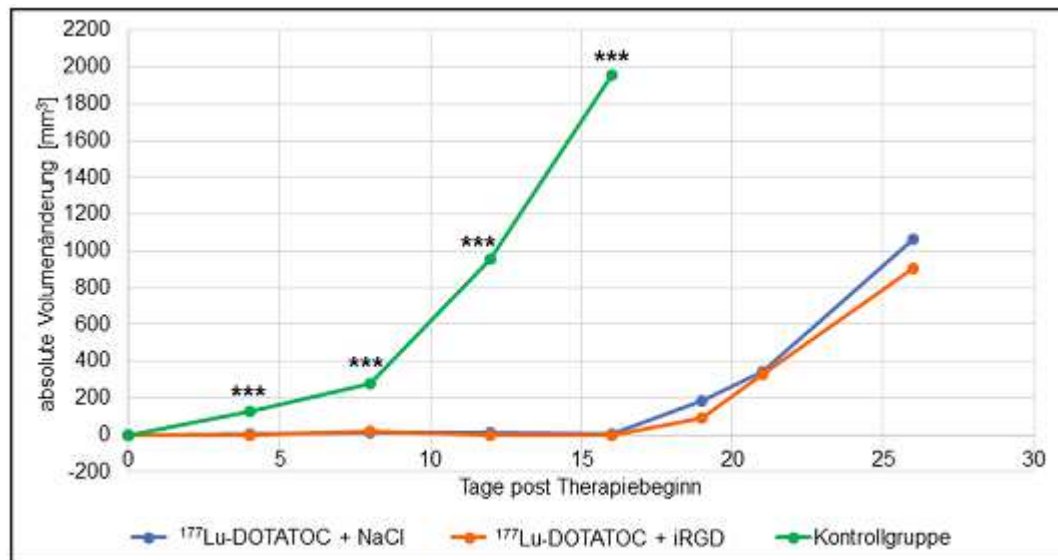
### 4.2.2 Tumorzvolumen und absolute Volumenänderung

Das Tumorzvolumen betrug bei den Mäusen zum Zeitpunkt des Therapiebeginns im Mittel  $50 \pm 23 \text{ mm}^3$ . Bei 2 Mäusen der iRGD-Therapiegruppe waren solide Tumoren sichtbar, allerdings war das Volumen nicht eindeutig zu bestimmen. Bei diesen beiden Tumoren war ein Anfangsvolumen von  $0 \text{ mm}^3$  definiert worden. Die absoluten Volumenänderungen wurden bis Tag 26 in den Therapiegruppen und bis Tag 16 in der Kontrollgruppe bewertet. Die Zahlenwerte und die Wachstumsverläufe wiesen in den beiden Therapiegruppen eine sehr ähnliche Tendenz auf, wenn sich auch die Werte der iRGD-Therapiegruppe für die absolute Volumenänderung als minimal kleiner darstellten (siehe Tabelle 17 und Abbildung 24). Die Volumenänderungen der beiden Therapiegruppen verliefen nicht signifikant unterschiedlich ( $p \geq 0,090$ ). Eine deutliche Wachstumsverzögerung durch die Therapie von über 16 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe war zu verzeichnen. Die absoluten Volumenänderungen schritten in der Kontrollgruppe ab Tag 4 mit  $p \leq 0,001$  höchst signifikant schneller voran als in beiden Therapiegruppen (siehe Tabelle 17 und Abbildung 24).

**Tabelle 17: Absolute Volumenänderung der Tumoren der verschiedenen Gruppen je Messzeitpunkt im Therapieversuch II**

Therapietage sind fett gedruckt (Tag 0 und Tag 8); n: Anzahl der Tiere, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung; NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

absolute Volumenänderung [ $\text{mm}^3$ ] (Mittelwerte und Standardabweichungen)						
Tage post Therapie	$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl (n = 14)		$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD (n = 13)		Kontrollgruppe (n = 7)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
4	5,95	22,46	-5,38	35,55	126,12	63,29
<b>8</b>	<b>15,96</b>	<b>47,09</b>	<b>20,18</b>	<b>34,41</b>	<b>279,44</b>	<b>191,54</b>
12	14,60	52,51	1,34	37,39	955,76	290,40
16	1,73	43,95	-4,43	33,03	1954,63	392,10
19	187,26	155,17	92,65	66,65	–	–
21	340,35	120,54	329,44	118,44	–	–
26	1066,28	377,48	907,23	295,10	–	–



**Abbildung 24: Absolute Volumenänderung der Tumoren im Therapieversuch II bis Tag 26 in den Therapiegruppen und bis Tag 16 in der Kontrollgruppe**

Angaben entsprechend der Mittelwerte aus Tabelle 17. Die eingezeichneten Sternchen stehen für signifikante Unterschiede bezüglich der absoluten Volumenänderung in [mm<sup>3</sup>] und bedeuten \*  $p < 0,05$  (signifikant), \*\*  $p < 0,01$  (hoch signifikant), \*\*\*  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant), Sternchen in schwarz: beide Therapiegruppen vs. Kontrollgruppe; NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

### 4.2.3 Körpergewicht

Nach Abzug des Tumorgewichtes vom Lebendgewicht am Todestag verzeichneten, im Vergleich zum Ausgangsgewicht, in der NaCl-Therapiegruppe 79 % ( $n = 11/14$ ) der Mäuse eine Gewichtszunahme und 21 % zeigten eine Gewichtsreduktion. In der iRGD-Therapiegruppe zeigten 85 % ( $n = 11/13$ ) ein konstantes Gewicht bzw. eine Gewichtszunahme. Bei 15 % wurde eine Gewichtsreduktion festgestellt. In der Kontrollgruppe hielten alle Mäuse ( $n = 7/7$ ) ihr Körpergewicht bzw. es konnte eine Gewichtszunahme festgestellt werden. Eine Reduktion des Körpergewichtes von  $> 10\%$  fand bei keiner Maus statt. Die Differenz vom Ausgangsgewicht zum tatsächlichen Endgewicht zwischen den beiden Therapiegruppen bzw. zwischen der jeweiligen Therapiegruppe und der Kontrollgruppe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ( $p \geq 0,610$ ) (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18: Verschiedene Gewichtsparameter der Mäuse im Therapieversuch II**

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung in Gramm [g]; n: Anzahl der Tiere, NaCl: Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Ausgangsgewicht	Lebendgewicht Euthanasietag	Tumorgewicht	Tatsächliches Endgewicht
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl ( $n = 14$ )	$22,9 \pm 1,5$	$25,1 \pm 1,5$	$1,5 \pm 0,3$	$23,5 \pm 1,3$
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD ( $n = 13$ )	$22,8 \pm 2,1$	$24,6 \pm 2,2$	$1,4 \pm 0,3$	$23,2 \pm 2,2$
Kontrollgruppe ( $n = 7$ )	$23,0 \pm 1,5$	$25,6 \pm 1,7$	$1,9 \pm 0,3$	$23,8 \pm 1,8$

## 4.2.4 <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie

### 4.2.4.1 Korrigierte Aufnahme­rate und tubuläre Exkretions­rate

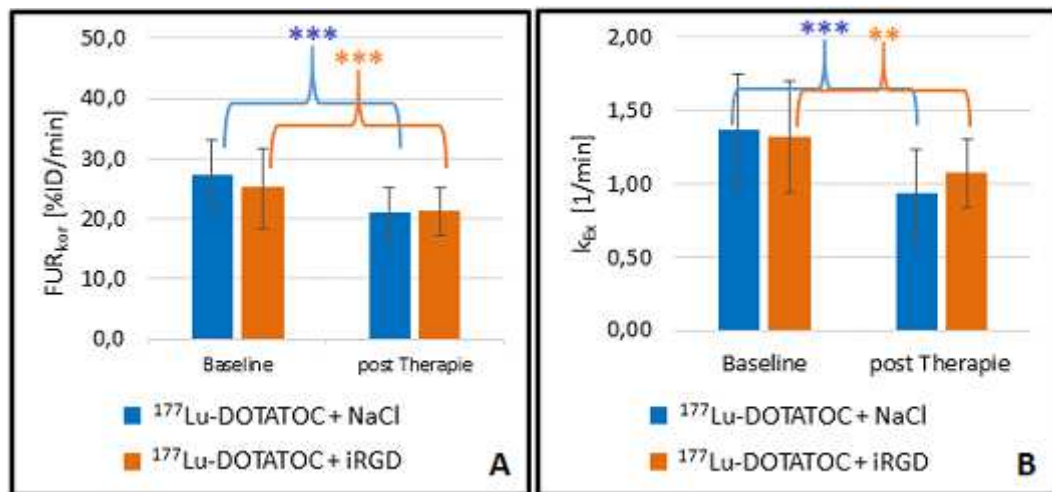
Bei den Baseline-Messungen wiesen beide Therapiegruppen sehr ähnliche Werte bezüglich der korrigierten Aufnahme­rate ( $FUR_{kor}$ ) und der Exkretions­rate ( $k_{Ex}$ ) auf. Bei den posttherapeutischen Messungen zeigte der Großteil der Mäuse beider Therapiegruppen eine Abnahme beider Parameter bei beiden Nieren, wobei die Werte für die Exkretions­rate in der NaCl-Therapiegruppe in geringem Maße schlechter waren als in der iRGD-Therapiegruppe (siehe Tabelle 19 und Abbildung 25). In der NaCl-Therapiegruppe verloren 2 Mäuse das Exkretionsvermögen jeweils in der linken Niere nahezu gänzlich. In der NaCl-Therapiegruppe zeigten beide Parameter höchst signifikante Veränderungen ( $p = 0,000$ ) für  $FUR_{kor}$  und  $k_{Ex}$  mit hauptsächlich niedrigeren Werten im Vergleich zur Baseline-Messung. Das nahezu gleiche Ergebnis, mit ebenfalls hauptsächlich verringerten Werten gegenüber der Baseline-Messung, konnte für die iRGD-Therapiegruppe verzeichnet werden. Hier erwies sich die  $FUR_{kor}$  mit  $p = 0,001$  als höchst signifikant und  $k_{Ex}$  mit  $p = 0,002$  als hochsignifikant (siehe Abbildung 25). Beide Therapiegruppen zeigten im Vergleich untereinander in ihren Veränderungen von der Baseline- zur posttherapeutischen Messung in der  $FUR_{kor}$  mit  $p = 0,118$  und in der Exkretions­rate mit  $p = 0,191$  kein signifikant unterschiedliches Verhalten.

**Tabelle 19: Mittelwerte mit Standardabweichung zur korrigierten Aufnahme­rate und zur tubulären Exkretions­rate im Therapieversuch II**

Je höher die Zahl, umso besser die  $FUR_{kor}$  (korrigierte Aufnahme­rate in [%ID/min]) bzw. Exkretion ( $k_{Ex}$ : tubuläre Exkretions­rate in [1/min]), negative Vorzeichen bedeuten ein Reduktion der Funktion.  $FUR$ -Werte in [%ID/min] zum Vergleich: NaCl-Therapiegruppe:  $13,0 \pm 1,9$  (Baseline);  $11,9 \pm 2,5$  (post Therapie);  $-1,1 \pm 3,2$  (Differenz); iRGD-Therapiegruppe:  $12,2 \pm 2,1$  (Baseline);  $12,2 \pm 1,9$  (post Therapie),  $0,0 \pm 2,1$  (Differenz); n: Anzahl der Tiere,  $FUR_{kor}$ : korrigierte Aufnahme­rate,  $k_{Ex}$ : tubuläre Exkretions­rate, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), %ID: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

Therapiegruppen	Baseline		post Therapie		Differenz post - Base	
	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 11)	$27,2 \pm 5,9$	$1,36 \pm 0,38$	$20,9 \pm 4,3$	$0,92 \pm 0,31$	$-6,2 \pm 5,9$	$-0,44 \pm 0,47$
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)	$25,0 \pm 6,6$	$1,32 \pm 0,38$	$21,1 \pm 3,9$	$1,07 \pm 0,23$	$-3,9 \pm 5,9$	$-0,25 \pm 0,36$



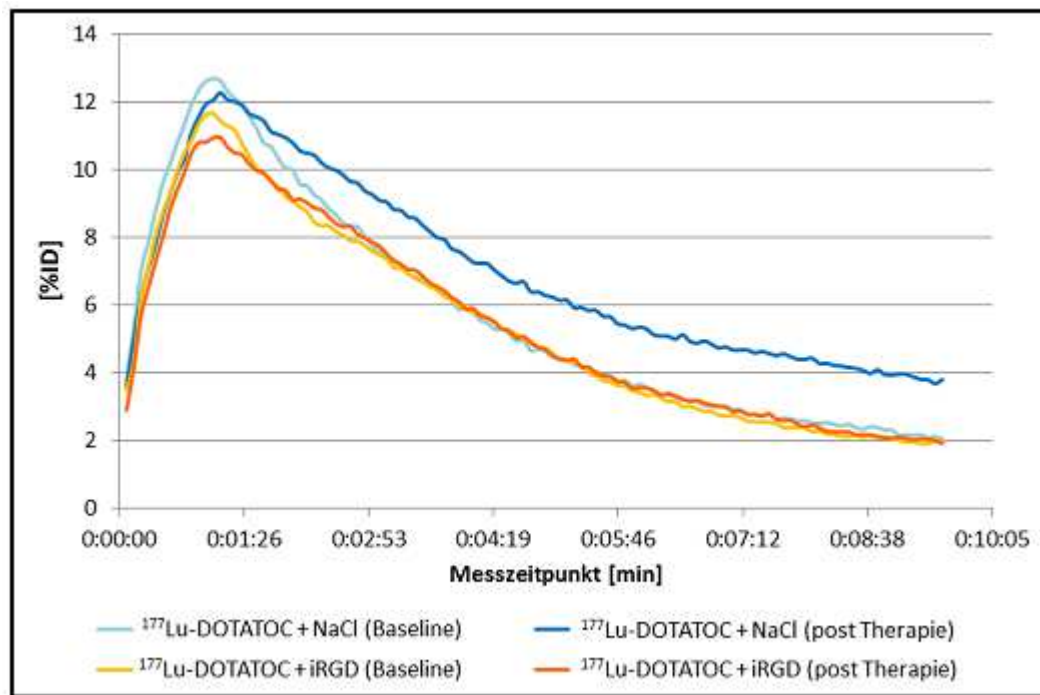


**Abbildung 25: Gegenüberstellung der korrigierten Aufnahme- und tubulären Exkretionsrate (B) der beiden Therapiegruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt im Therapieversuch II**

Mittelwerte und Standardabweichungen entsprechen den Zahlenwerten aus Tabelle 19. Sternchen stehen für signifikante Unterschiede Baseline vs. post Therapie \*  $p < 0,05$  (signifikant), \*\*  $p < 0,01$  (hoch signifikant), \*\*\*  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant); FUR<sub>kor</sub>: korrigierte Aufnahme- rate, k<sub>ex</sub>: tubuläre Exkretionsrate, NaCl: Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

#### 4.2.4.2 Renogramm-Kurven

Die Renogramm-Kurven der Mäuse (siehe Abbildung 26) weisen in beiden Therapiegruppen sowohl hinsichtlich der Baseline-Messung als auch bei der posttherapeutischen Messung eine steile Anflutungsphase auf. Der Peak %ID der NaCl-Therapiegruppe ist bezüglich beider Messzeitpunkte geringfügig höher als in der iRGD-Therapiegruppe. Bei beiden Therapiegruppen fielen die Peaks bei der posttherapeutischen Messung tendenziell niedriger aus. Bei der iRGD-Therapiegruppe fallen die Kurven bezüglich beider Messzeitpunkte in fast identischem Maße steil ab, wohingegen die Kurve, die die posttherapeutische Messung in der NaCl-Therapiegruppe widerspiegelt, flacher als die ihrer Baseline-Messung verläuft. Die Therapiegruppen zeigten im Vergleich untereinander keine signifikant unterschiedlichen Veränderungen für den Peak %ID ( $p = 0,698$ ) und für die TTP ( $p = 0,230$ ). Die Veränderung in der TTP innerhalb der NaCl-Therapiegruppe stellte sich mit  $p = 0,034$  und hauptsächlich verlängerten Zeiten als signifikant dar. Der Peak %ID bei beiden Therapiegruppen und die TTP bei der iRGD-Therapiegruppe erwiesen sich im Vergleich zwischen Baseline- und posttherapeutischer Messung als nicht signifikant verändert (NaCl-Therapiegruppe: Peak %ID  $p = 0,201$ ; iRGD-Therapiegruppe: Peak %ID  $p = 0,418$ ; TTP  $p = 0,861$ ). Zahlenwerte zum Peak %ID und TTP sind Tabelle 20 zu entnehmen.



**Abbildung 26: Renogramm-Kurven aus den Daten von Baseline- und posttherapeutischen Nierenszintigraphien der Mäuse beider Therapiegruppen im Therapieversuch II**

Die jeweilige Renogramm-Kurven wurden aus Mittelwerten der Messdaten der Baseline- und posttherapeutischen Messungen von  $n = 11$  Mäusen in der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl und  $n = 12$  Mäusen in der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD generiert. Die Standardabweichungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet; NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID]: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

**Tabelle 20: Zahlenwerte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen) für Peak %ID und TTP zu den Renogramm-Kurven im Therapieversuch II**

Die hier gelisteten MW für den Peak %ID stellen sich geringfügig höher dar, als jene im Renogramm, da die MW der Tabelle aus sämtlichen Einzelwerten von linker und rechter Niere erstellt wurden und anders als in der Renogramm-Kurve hierfür das zeitlich unterschiedliche Eintreten der Peaks %ID bei linker und rechter Niere nicht berücksichtigt wurden; n: Anzahl der Tiere, TTP: Time to Peak, s: Sekunde, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

Therapiegruppen	Mittelwerte und Standardabweichung beider Nieren			
	Peak %ID		Time to Peak [s]	
	Baseline	post Therapie	Baseline	post Therapie
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl (n = 11)	13,4 $\pm$ 3,0	13,6 $\pm$ 4,5	67 $\pm$ 12	102 $\pm$ 110
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD (n = 12)	12,3 $\pm$ 2,3	11,7 $\pm$ 2,3	66 $\pm$ 10	68 $\pm$ 20

#### 4.2.5 Blutparameter

In beiden Therapiegruppen wiesen die Mäuse in Hinblick auf die Blutparameter eine ähnliche Werteverteilung auf. Bei Harnstoff und Leukozyten zeigte in etwa jeweils die Hälfte der Mäuse in beiden Therapiegruppen Werte im Referenzbereich sowie Werte darunter. Die Abweichungen der Werte vom Referenzbereich bei den Leukozyten waren geringfügig. Hinsichtlich des Kreatinins bewegten sich die Werte des Großteils der Mäuse deutlich oberhalb des Referenzbereiches, wohingegen bei den Thrombozyten die meisten Tiere eindeutig zu niedrige Werte aufwiesen. Eine detaillierte Darstellung der Blutparameter sowie die prozentuale Aufgliederung der Werte der Mäuse im Referenzbereich bzw. außerhalb des Referenzbereiches je Therapiegruppe ist Tabelle 21 zu entnehmen. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Blutwerte zwischen beiden Therapiegruppen konnte nicht festgestellt werden ( $p \geq 0,165$ ).

**Tabelle 21: Blutwerte der therapierten Mäuse im Therapieversuch II inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe**

n: Anzahl der Tiere, Ref.be.: Referenzbereich, l: Liter, G: Giga, mmol: Millimol,  $\mu$ mol: Micromol, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Harnstoff [mmol/l]	Kreatinin [ $\mu$ mol/l]	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]
<b>Referenzbereich (n = 15)</b>	<b>5,8–9,8</b>	<b>12–24</b>	<b>0,9–2,1</b>	<b>439–999</b>
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + NaCl (n = 14)</b>			<b>(n = 9)</b>	
Absolute Werte	1,4–7,6	16–58	0,6–2,2	105–501
% im Ref.be.	50 (n = 7)	7 (n = 1)	44,5 (n = 4)	22 (n = 2)
% unter Ref.be.	50 (n = 7)	–	44,5 (n = 4)	78 (n = 7)
% über Ref.be.	–	93 (n = 14)	11 (n = 1)	–
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)</b>			<b>(n = 10)</b>	
Absolute Werte	4,1–7,3	21–72	0,3–1,3	90–433
% im Ref.be.	50 (n = 6)	8 (n = 1)	50 (n = 5)	–
% unter Ref.be.	50 (n = 6)	8 (n = 1)	50 (n = 5)	100
% über Ref.be.	–	84 (n = 10)	–	–

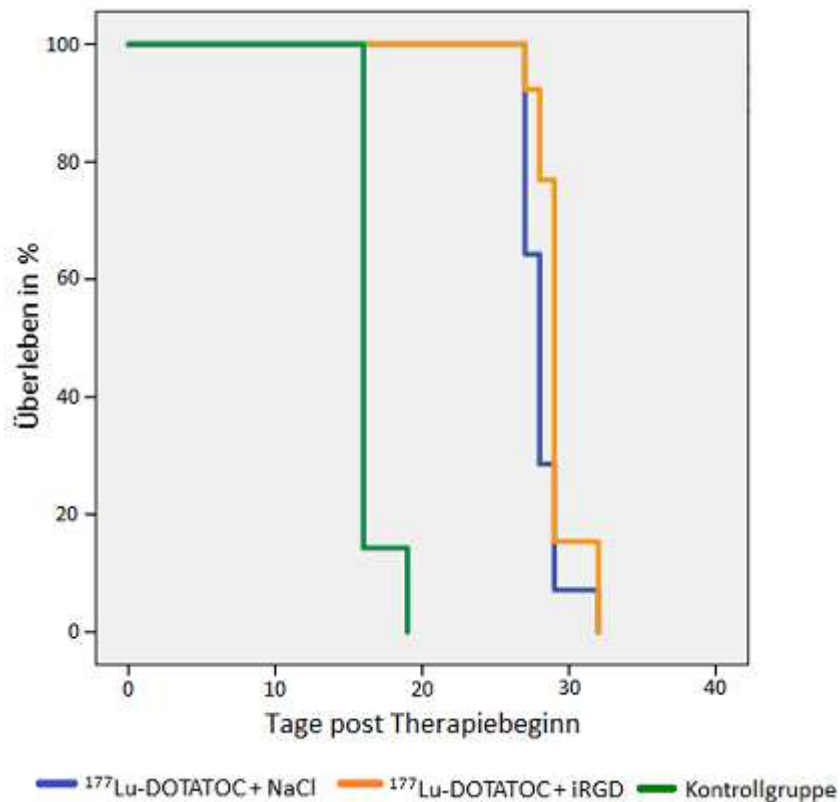
#### 4.2.6 Auswertung der Überlebensdaten

Alle Mäuse in diesem Versuch mussten ausschließlich aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien bezüglich des Tumors euthanasiert werden. Bis auf eine Maus waren alle Tiere am Euthanasietag bei gutem Allgemeinbefinden. In der NaCl-Therapiegruppe wiesen die Mäuse eine mittlere Überlebenszeit von  $28,1 \pm 0,4$  Tagen auf, in der iRGD-Therapiegruppe von  $29,2 \pm 0,4$  Tagen und in der Kontrollgruppe von  $16,4 \pm 0,4$  Tagen. Tabelle 22 gibt eine Übersicht über die Anzahl der euthanasierten Mäuse sowie den prozentualen Anteil der überlebenden Mäuse in den jeweiligen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt. Es konnte für alle drei Signifikanztests ein signifikanter Unterschied zugunsten der iRGD-Therapiegruppe mit  $p < 0,05$  festgestellt werden. Zwischen der Kontrollgruppe und jeder der beiden Therapiegruppen wurde für alle drei Signifikanztests mit  $p = 0,000$  stets ein höchst signifikanter Unterschied festgestellt. Das entsprechende Kaplan-Meier-Diagramm zeigt Abbildung 27.

**Tabelle 22: Anzahl euthanasierter Mäuse und prozentualer Anteil der überlebenden Mäuse je Gruppe und Zeitpunkt im Therapieversuch II**

Die Euthanasie erfolgte aufgrund des Eintretens der Abbruchkriterien bezüglich der Tumoren; prozentualer Anteil bestimmt ausgehend von 100 % am Tag 0; n: Anzahl der Tiere, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

Tage post Therapiebeginn	16	19	27	28	29	32
<b>Anzahl euthanasierter Mäuse</b>						
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 14)	0	0	5	5	3	1
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 13)	0	0	1	2	8	2
Kontrollgruppe (n = 7)	6	1	–	–	–	–
<b>überlebende Mäuse in %</b>						
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	100	100	64	29	7	0
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	100	100	92	77	14	0
Kontrollgruppe	14	0	–	–	–	–



**Abbildung 27: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Mäuse der jeweiligen Gruppen im Therapieversuch II**

Ausgangstierzahl je Gruppe:  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl:  $n = 14$ ,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD:  $n = 13$ , Kontrollgruppe:  $n = 7$ . Signifikanzen: NaCl-Therapiegruppe vs. iRGD-Therapiegruppe bei allen drei Signifikanztests signifikant unterschiedlich: Breslow-Test (Generalized Wilcoxon)  $p = 0,019$ , Tarone-Ware-Test  $p = 0,022$  und Log-Rank-Test  $p = 0,029$ ; Therapiegruppen vs. Kontrollgruppe: Breslow-Test (Generalized Wilcoxon), Tarone-Ware-Test und Log-Rank-Test höchst signifikant unterschiedlich ( $p = 0,000$ );  $n$ : Anzahl der Tiere, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

### **4.3 Therapieversuch III mit zwei Therapiezyklen und modifiziertem iRGD-Regime**

#### **4.3.1 Effektiv erhaltenes $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC**

Die Mäuse beider Therapiegruppen erhielten je Therapiezyklus effektiv  $50 \pm 5$  MBq des therapeutisch wirksamen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

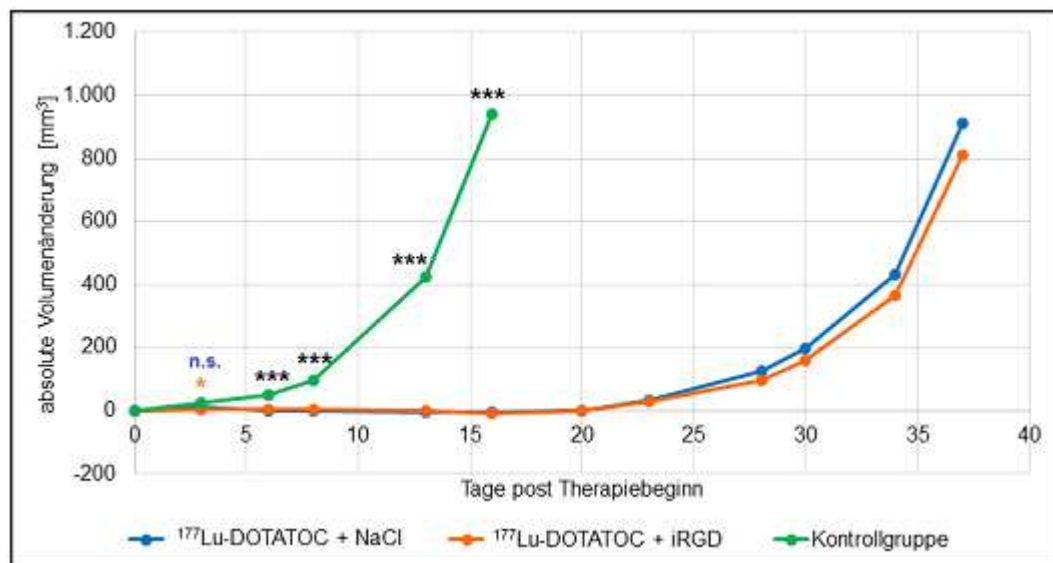
#### **4.3.2 Tumervolumen und absolute Volumenänderung**

Das Tumervolumen betrug zum Zeitpunkt des Therapiebeginns  $24 \pm 10$  mm<sup>3</sup>. Die absoluten Volumenänderungen wurden bis Tag 37 in den Therapiegruppen und bis Tag 16 in der Kontrollgruppe bewertet. Die Zahlenwerte zeigen in den beiden Therapiegruppen eine sehr ähnliche Tendenz (siehe Tabelle 23). Bis Tag 16 verzeichneten die Tumervolumina im Vergleich zum Ausgangswert in den Therapiegruppen einen leichten Rückgang, zwischen Tag 16 und Tag 20 sprachen die Werte für eine Umkehr dieser Tendenz. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten nur eine leichte Stagnation des Tumorwachstums zwischen Tag 0 und Tag 3, ab Tag 3 zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Wachstumskurve. Die Volumenänderungen der Tumoren in beiden Therapiegruppen verliefen nicht signifikant unterschiedlich ( $p \geq 0,089$ ) (siehe Tabelle 23 und Abbildung 28). Durch die Therapie war eine deutliche Wachstumsverzögerung von über 20 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Zwischen der NaCl-Therapiegruppe und der Kontrollgruppe wies die Volumenänderung für Tag 3 mit  $p = 0,088$  keine Signifikanz auf. Die Tumoren wuchsen in der Kontrollgruppe bereits ab Tag 3 mit  $p = 0,014$  signifikant schneller als in der iRGD-Therapiegruppe. Ab Tag 6 schritt die absolute Volumenänderung in der Kontrollgruppe mit  $p = 0,000$  höchst signifikant schneller voran als in beiden Therapiegruppen (siehe Tabelle 23 und Abbildung 28).

**Tabelle 23: Absolute Volumenänderung der Tumoren der verschiedenen Gruppen je Messzeitpunkt im Therapieversuch III**

Therapietage sind fett gedruckt (Tag 0 und Tag 8); n: Anzahl der Tiere, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

<b>absolute Volumenänderung [mm<sup>3</sup>] (Mittelwerte und Standardabweichungen)</b>						
Tage post Therapie	<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 14)		<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 14)		Kontrollgruppe (n = 8)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
3	11,45	12,23	4,96	17,83	24,39	15,57
6	0,91	12,27	3,19	9,48	48,29	62,11
<b>8</b>	<b>1,37</b>	<b>11,57</b>	<b>3,36</b>	<b>9,25</b>	<b>94,93</b>	<b>86,62</b>
13	-2,61	9,96	-1,41	7,21	425,70	306,24
16	-6,40	11,83	-9,30	6,84	941,75	676,69
20	-0,06	11,95	0,52	11,57	–	–
23	33,03	24,27	27,89	14,23	–	–
28	124,42	63,81	97,59	63,80	–	–
30	197,13	87,18	159,83	83,60	–	–
34	431,05	186,39	363,34	183,82	–	–
37	909,95	410,28	811,98	414,86	–	–

**Abbildung 28: Absolute Volumenänderung der Tumoren im Therapieversuch III bis Tag 37 in den Therapiegruppen und Tag bis 16 in der Kontrollgruppe**

Angaben entsprechend der Mittelwerte aus Tabelle 23. Die eingezeichneten Sternchen stehen für signifikante Unterschiede bezüglich der absoluten Volumenänderung in [mm<sup>3</sup>] und bedeuten n. s. (nicht signifikant), \*  $p < 0,05$  (signifikant), \*\*  $p < 0,01$  (hochsignifikant), \*\*\*  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant), Sternchen in schwarz: beide Therapiegruppen vs. Kontrollgruppe; Sternchen / n. s. farbig: jeweilige Therapiegruppe vs. Kontrollgruppe; NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

### 4.3.3 Körpergewicht

In allen Gruppen konnte meist eine Gewichtszunahme festgestellt werden. Nach Abzug des Tumorgewichtes vom Lebendgewicht am Todestag verzeichneten im Vergleich zum Ausgangsgewicht in der NaCl-Therapiegruppe 64 % (n = 9/14) der Mäuse eine Gewichtszunahme und 36 % der Mäuse zeigten eine Gewichtsreduktion. In der iRGD-Therapiegruppe wiesen 79 % (n = 11/14) eine Gewichtszunahme auf. Bei 21 % der Tiere wurde eine Gewichtsreduktion festgestellt. In der Kontrollgruppe nahmen 87,5 % (n = 7/8) zu. Lediglich eine Maus der Kontrollgruppe verlor an Körpergewicht gegenüber ihrem Ausgangsgewicht. Die Gewichtsänderungen vom Ausgangsgewicht zum tatsächlichen Endgewicht zwischen den beiden Therapiegruppen bzw. zwischen der jeweiligen Therapiegruppe und der Kontrollgruppe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ( $p \geq 0,094$ ) (siehe Tabelle 24).

**Tabelle 24: Verschiedene Gewichtsparameter der Mäuse im Therapieversuch III**

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung in Gramm [g]; n: Anzahl der Tiere, NaCl: Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Ausgangsgewicht	Lebendgewicht Euthanasietag	Tumorgewicht	Tatsächliches Endgewicht
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 14)	22,5 ± 1,8	24,5 ± 2,2	1,6 ± 0,4	22,8 ± 1,9
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 14)	21,9 ± 2,2	24,7 ± 2,3	1,9 ± 0,4	22,9 ± 2,1
Kontrollgruppe (n = 8)	22,6 ± 2,9	25,1 ± 2,8	1,7 ± 0,6	23,4 ± 2,5



### 4.3.4 <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie

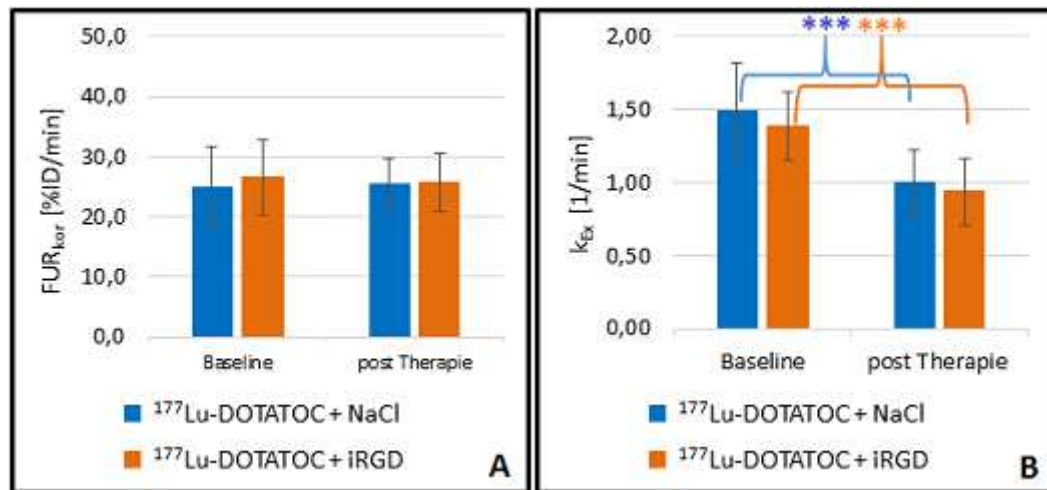
#### 4.3.4.1 Korrigierte Aufnahme­rate und tubuläre Exkretions­rate

Beide Therapiegruppen hatten nahezu identische Werte für die korrigierte Aufnahme­rate ( $FUR_{kor}$ ) in der Baseline-Messung. Die  $FUR_{kor}$  zeigte sich bei den posttherapeutischen Messungen bei beiden Therapiegruppen ebenfalls nahezu unverändert, was sich mit  $p = 1,000$  in der NaCl-Therapiegruppe und mit  $p = 0,314$  in der iRGD-Therapiegruppe als nicht signifikant unterschiedlich widerspiegelte (siehe Tabelle 25 und Abbildung 29 A). Die Exkretion betrachtend waren die Werte der NaCl-Therapiegruppe bei der Baseline-Messung geringfügig höher als die der iRGD-Therapiegruppe. Eine höchst signifikante ( $p = 0,000$ ) Veränderung, mit vornehmlich niedrigeren Werten bei der posttherapeutischen Messung für die tubuläre Exkretions­rate ( $k_{Ex}$ ), konnten gleichermaßen für beide Therapiegruppen verzeichnet werden (siehe Tabelle 25 und Abbildung 29 B). Beide Therapiegruppen zeigten im Vergleich untereinander in ihren Veränderungen von der Baseline- zur posttherapeutischen Messung bezüglich der  $FUR_{kor}$  mit  $p = 0,599$  und der  $k_{Ex}$  mit  $p = 0,478$  kein signifikant unterschiedliches Verhalten.

**Tabelle 25: Mittelwerte mit Standardabweichung zur korrigierten Aufnahme­rate und zur tubulären Exkretions­rate im Therapieversuch III**

Je höher die Zahl, umso besser die  $FUR_{kor}$  (korrigierte Aufnahme­rate in [%ID/min]) bzw. Exkretion ( $k_{Ex}$ : tubuläre Exkretions­rate in [1/min]), negative Vorzeichen bedeuten ein Reduktion der Funktion.  $FUR$ -Werte in [%ID/min] zum Vergleich: NaCl-Therapiegruppe:  $12,0 \pm 2,9$  (Baseline);  $13,4 \pm 1,9$  (post Therapie);  $1,4 \pm 2,9$  (Differenz); iRGD-Therapiegruppe:  $12,9 \pm 2,8$  (Baseline);  $13,7 \pm 2,5$  (post Therapie),  $0,8 \pm 2,4$  (Differenz); n: Anzahl der Tiere,  $FUR_{kor}$ : korrigierte Aufnahme­rate,  $k_{Ex}$ : tubuläre Exkretions­rate, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), %ID: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

Therapiegruppen	Baseline		post Therapie		Differenz post - Base	
	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$	$FUR_{kor}$	$k_{Ex}$
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 12)	$24,8 \pm 6,8$	$1,49 \pm 0,33$	$25,4 \pm 4,2$	$1,00 \pm 0,22$	$0,6 \pm 6,5$	$-0,49 \pm 0,31$
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 13)	$26,6 \pm 6,4$	$1,38 \pm 0,23$	$25,6 \pm 4,9$	$0,94 \pm 0,23$	$-0,9 \pm 4,8$	$-0,44 \pm 0,30$

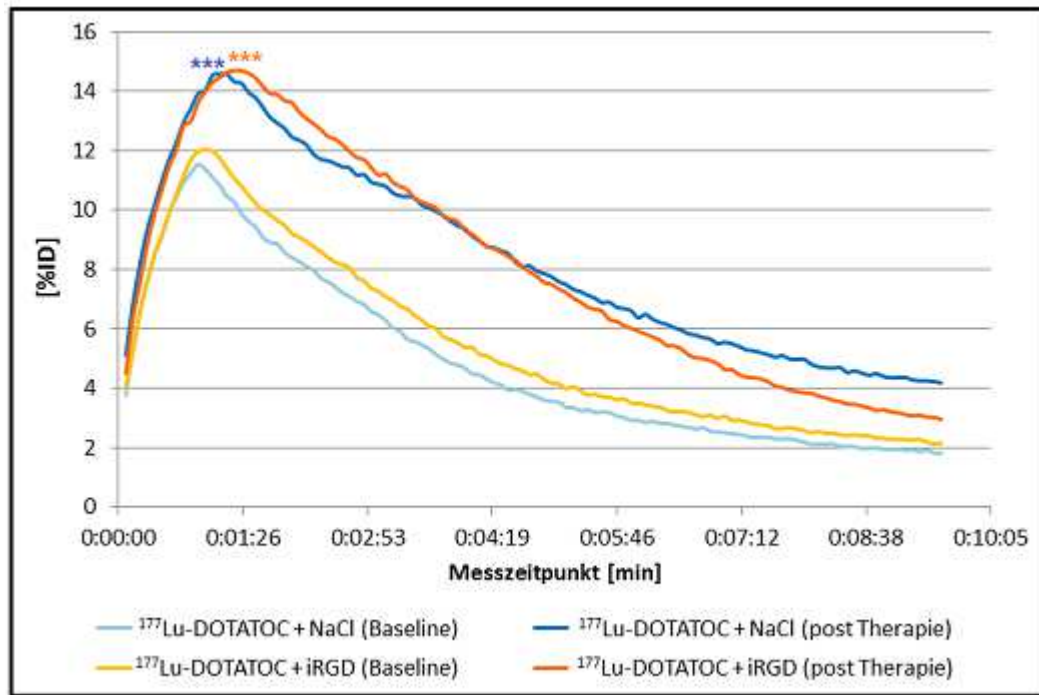


**Abbildung 29: Gegenüberstellung der korrigierten Aufnahme- und tubulären Exkretionsrate (B) der beiden Therapiegruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt im Therapieversuch III**

Mittelwerte und Standardabweichungen entsprechen den Zahlenwerten aus Tabelle 25. Die eingezeichneten Sternchen stehen für signifikante Unterschiede Baseline vs. post Therapie \*  $p < 0,05$  (signifikant), \*\*  $p < 0,01$  (hoch signifikant), \*\*\*  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant); farbige Sternchen beziehen sich auf jeweilige Therapiegruppe; FUR<sub>kor</sub>: korrigierte Aufnahme- und tubuläre Exkretionsrate, k<sub>ex</sub>: tubuläre Exkretionsrate, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), %ID: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

#### 4.3.4.2 Renogramm-Kurven

Die Renogramm-Kurven der Mäuse (siehe Abbildung 30) zeigen bezüglich beider Therapiegruppen hinsichtlich der Baseline-Messung steile Anflutungsphasen. Die Kurven der posttherapeutischen Messungen beider Therapiegruppen zeigen sich geringfügig weniger steil. Die Peaks %ID beider Therapiegruppen gleichen sich untereinander bezüglich beider Messzeitpunkte. Sie erhöhten sich bei beiden Therapiegruppen bei den posttherapeutischen Messungen im Vergleich zur Baseline. Der Kurvenabfall verläuft in beiden Therapiegruppen bei der posttherapeutischen Messung weniger steil als in der der Baseline-Messung, wobei die Kurve der iRGD-Therapiegruppe in ihrem Verlauf unter die der NaCl-Therapiegruppe fällt. Beide Therapiegruppen zeigten im Vergleich untereinander keine signifikant unterschiedlichen Veränderungen für den Peak %ID ( $p = 0,821$ ) und für die TTP ( $p = 0,785$ ). Eine vornehmliche Erhöhung der Werte für Peak %ID und TTP im Vergleich zwischen Baseline- und posttherapeutischer Messung zeigten beide Therapiegruppen. Jene Veränderungen innerhalb der Therapiegruppen stellten sich jeweils mit  $p = 0,000$  als höchst signifikant dar. Zahlenwerte zu dem Peak %ID und der TTP sind in Tabelle 26 zu finden.



**Abbildung 30: Renogramm-Kurven aus den Daten von Baseline- und posttherapeutischen Nierenszintigraphien der Mäuse beider Therapiegruppen im Therapieversuch III**

Die jeweilige Renogramm-Kurven wurden aus den Mittelwerten der Messdaten der Baseline- und posttherapeutischen Messungen von  $n = 12$  in  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl und  $n = 13$  in  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD generiert. Die Standardabweichungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Die eingezeichneten Sternchen stehen für signifikante Unterschiede Baseline vs. post Therapie \*  $p < 0,05$  (signifikant), \*\*  $p < 0,01$  (hoch signifikant), \*\*\*  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant); blaue Sternchen beziehen sich auf die NaCl-Therapiegruppe ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl); orange Sternchen beziehen sich auf die iRGD-Therapiegruppe ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD); NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst), [%ID]: Prozent der injizierten Aktivität, min: Minute

**Tabelle 26: Zahlenwerte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen) für Peak %ID und TTP zu den Renogramm-Kurven im Therapieversuch III**

Die hier gelisteten MW für den Peak %ID stellen sich geringfügig höher dar, als jene im Renogramm, da die MW der Tabelle aus sämtlichen Einzelwerten von linker und rechter Niere erstellt wurden und anders als in der Renogramm-Kurve hierfür das zeitlich unterschiedliche Eintreten der Peaks %ID bei linker und rechter Niere nicht berücksichtigt wurden; n: Anzahl der Tiere, TTP: Time to Peak, s: Sekunde, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

Therapiegruppen	Mittelwerte und Standardabweichung beider Nieren			
	Peak %ID		Time to Peak [s]	
	Baseline	post Therapie	Baseline	post Therapie
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl (n = 12)	12,0 $\pm$ 3,0	15,6 $\pm$ 3,2	57 $\pm$ 10	101 $\pm$ 104
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD (n = 13)	12,5 $\pm$ 2,4	16,1 $\pm$ 3,2	63 $\pm$ 11	88 $\pm$ 27

### 4.3.5 Blutparameter

Die Mäuse der beiden Therapiegruppen wiesen in Hinblick auf die Blutparameter eine ähnliche Werteverteilung auf. Beim Harnstoff zeigte etwas mehr als die Hälfte der Mäuse in beiden Therapiegruppen Werte im Referenzbereich und etwas weniger als die Hälfte der Tiere Werte darunter. Die Leukozytenzahlen hielten sich beim Großteil der Mäuse im Referenzbereich, wohingegen die Thrombozytenwerte allgemein deutlich unterhalb der Referenzwerte waren. Der Kreatininwert lag bei nahezu allen Mäusen im Referenzbereich. Bis auf wenige Ausnahmen, hier v. a. bezüglich der Thrombozyten, wichen die meisten Werte allerdings nur in geringem Maße von den Referenzwerten ab. Eine detaillierte Darstellung der Blutparameter sowie die prozentuale Aufgliederung der Mäuse im Referenzbereich bzw. außerhalb des Referenzbereiches je Therapiegruppe ist Tabelle 27 zu entnehmen. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Blutwerte zwischen beiden Therapiegruppen konnte nicht festgestellt werden ( $p \geq 0,244$ ).

**Tabelle 27: Blutwerte der therapierten Mäuse im Therapieversuch III inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe**

n: Anzahl der Tiere, Ref.be.: Referenzbereich, l: Liter, G: Giga, mmol: Millimol,  $\mu$ mol: Micromol, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Harnstoff [mmol/l]	Kreatinin [ $\mu$ mol/l]	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]
<b>Referenzbereich (n = 15)</b>	<b>5,8–9,8</b>	<b>12–24</b>	<b>0,9–2,1</b>	<b>439–999</b>
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + NaCl (n = 14)</b>	<b>(n = 10)</b>			
absolute Werte	4,5–10,0	13–23	0,7–2,1	53–1014
% im Ref.be.	57 (n = 8)	100	90 (n = 9)	10 (n = 1)
% unter Ref.be.	36 (n = 5)	–	10 (n = 1)	80 (n = 8)
% über Ref.be.	7 (n = 1)	–	–	10 (n = 1)
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)</b>	<b>(n = 10)</b>			
absolute Werte	4,0–9,5	10–24	0,9–3,3	68–397
% im Ref.be.	58 (n = 7)	92 (n = 11)	70 (n = 7)	–
% unter Ref.be.	42 (n = 5)	8 (n = 1)	–	100
% über Ref.be.	–	–	30 (n = 3)	–

### 4.3.6 Blutausstriche

Im Allgemeinen lagen die Werte des Großteils der Mäuse beider Therapiegruppen in den jeweiligen Referenzbereichen. In der NaCl-Therapiegruppe befanden sich etwas mehr Tiere außerhalb der Referenzbereiche der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Jene Mäuse beider Therapiegruppen, deren Werte nicht im Referenzbereich lagen, wiesen allerdings nur geringfügige Abweichungen zu den oberen bzw. unteren Grenzen der gesunden Referenztiere auf. In Tabelle 28 sind entsprechende Zahlenwerte aufgeführt. In einigen Fällen (n = 5 je Therapiegruppe) fiel eine hochgradige Polychromasie der Erythrozyten auf. Die Ergebnisse beider Therapiegruppen im Vergleich stellten sich als nicht signifikant dar ( $p \geq 0,335$ ).

**Tabelle 28: Blutausstriche der therapierten Mäuse im Therapieversuch III inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe**

n: Anzahl der Tiere, Ref.be.: Referenzbereich, l: Liter, G: Giga, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

	Segment- kernige %	Lympho- zyten %	Monozyten %	Eosinophile %	Basophile %	Stabkernige %
<b>Referenz (n = 10)</b>	<b>58–85</b>	<b>8–23</b>	<b>6–17</b>	<b>0–4</b>	<b>0</b>	<b>0–3</b>
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + NaCl (n = 14)</b>						
absolute Werte	52–90	4–34	2–19	0–6	0–1	0–3
% im Ref.be.	50 (n = 7)	50 (n = 7)	57 (n = 8)	93 (n = 13)	93 (n = 13)	100
% unter Ref.be.	14 (n = 2)	43 (n = 6)	36 (n = 5)	–	–	–
% über Ref.be.	36 (n = 5)	7 (n = 1)	7 (n = 1)	7 (n = 1)	7 (n = 1)	–
<b><sup>177</sup>Lu-DOTATOC + iRGD (n = 12)</b>						
absolute Werte	60–92	3–24	2–17	0–5	0	0–3
% im Ref.be.	83 (n = 10)	75 (n = 9)	58 (n = 7)	92 (n = 11)	100	100
% unter Ref.be.	–	17 (n = 2)	42 (n = 5)	8 (n = 1)	–	–
% über Ref.be.	17 (n = 2)	8 (n = 1)	–	–	–	–

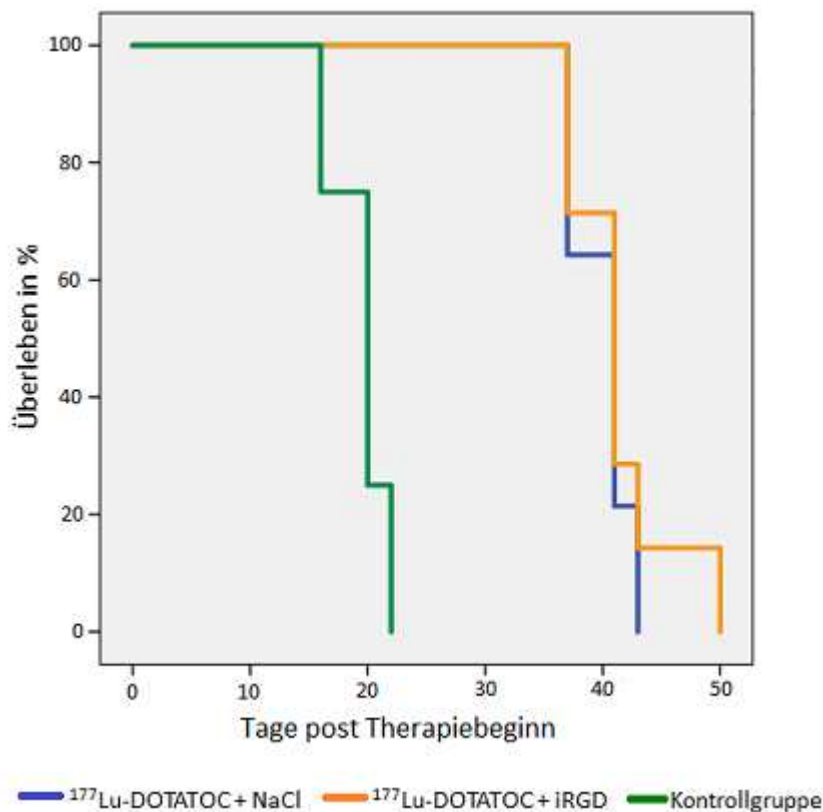
### 4.3.7 Auswertung der Überlebensdaten

Alle im Versuch befindlichen Mäuse wurden aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien bezüglich des Tumors euthanasiert. Die Mäuse waren am Tag der Euthanasie bei gutem Allgemeinbefinden. In der NaCl-Therapiegruppe wiesen die Mäuse eine mittlere Überlebenszeit von  $40,0 \pm 0,7$  Tagen auf, in der iRGD-Therapiegruppe von  $41,4 \pm 1,1$  Tagen und in der Kontrollgruppe von  $19,5 \pm 0,8$  Tagen. Tabelle 29 gibt eine Übersicht über die euthanasierten Mäuse sowie den prozentualen Anteil der überlebenden Mäuse in den jeweiligen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt. Eine Signifikanz zwischen beiden Therapiegruppen konnte diesbezüglich mit keinem der angewendeten Signifikanztests festgestellt werden ( $p \geq 0,346$ ). Die Abbruchkriterien traten bei den Mäuse in beiden Therapiegruppen höchst signifikant später ein als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,000$  für alle drei Signifikanztests). Das entsprechende Kaplan-Meier-Diagramm zeigt Abbildung 31.

**Tabelle 29: Anzahl euthanasierter Mäuse und prozentualer Anteil der überlebenden Mäuse je Gruppe und Zeitpunkt im Therapieversuch III**

Die Euthanasie erfolgte aufgrund des Eintretens der Abbruchkriterien bezüglich der Tumoren; prozentualer Anteil bestimmt ausgehend von 100 % am Tag 0; n: Anzahl der Tiere, NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

Tage post Therapiebeginn	16	20	22	37	41	43	50
<b>Anzahl euthanasierter Mäuse</b>							
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl (n = 14)	0	0	0	5	6	3	–
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD (n = 14)	0	0	0	4	6	2	2
Kontrollgruppe (n = 8)	2	4	2	–	–	–	–
<b>überlebende Mäuse in %</b>							
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + NaCl	100	100	100	64	21	0	0
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC + iRGD	100	100	100	71	29	14	0
Kontrollgruppe	75	25	0	–	–	–	–



**Abbildung 31: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Mäuse der jeweiligen Gruppen im Therapieversuch III**

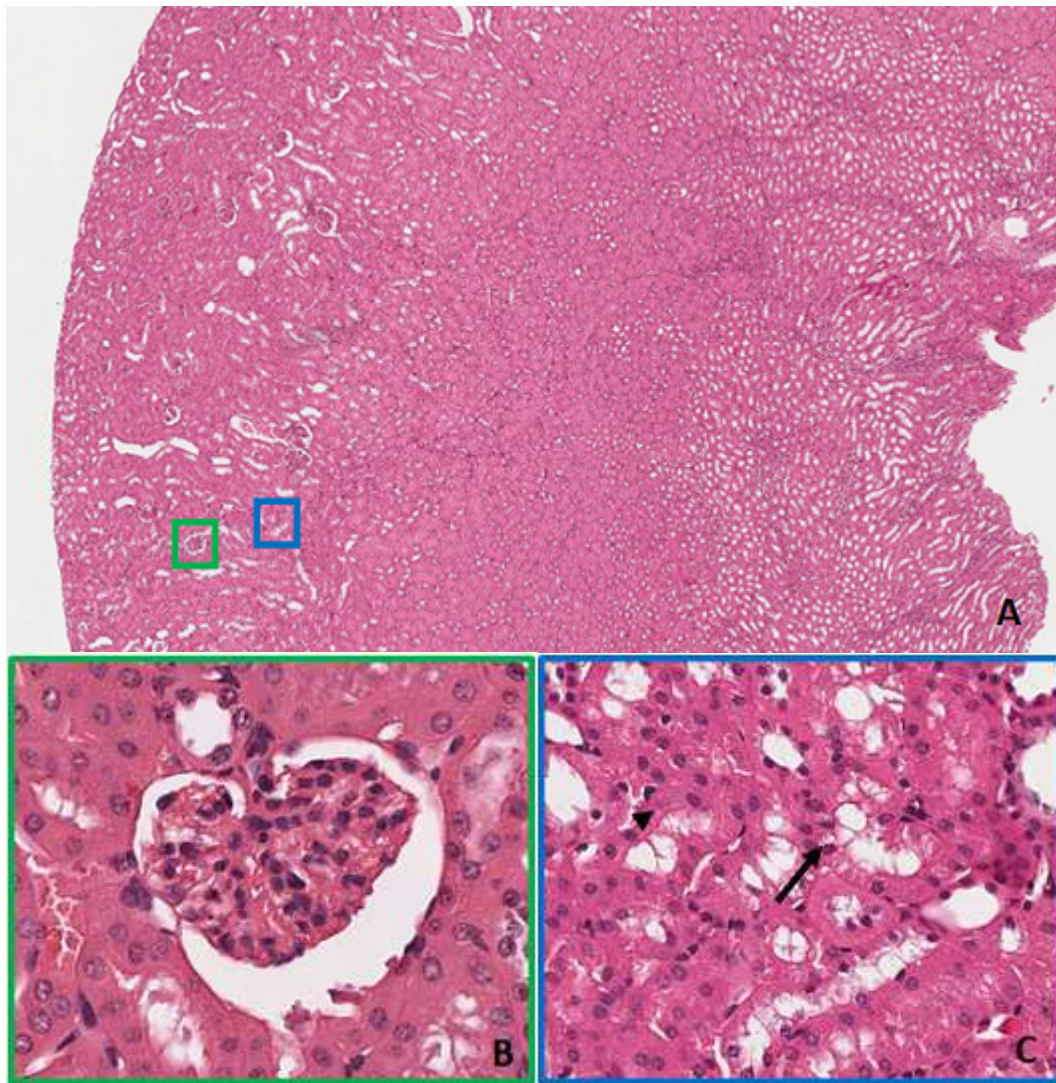
Ausganstierzahl je Gruppe:  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + NaCl:  $n = 14$ ,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC + iRGD:  $n = 14$ , Kontrollgruppe:  $n = 8$ . Therapiegruppen vs. Kontrollgruppe: Breslow-Test, Tarone-Ware-Test und Log-Rank-Test höchst signifikant ( $p = 0,000$ ); NaCl: steht für Natriumchlorid-Lösung, iRGD: iRGD-Peptid (gelöst)

#### 4.3.8 Histologische Beurteilung der Nieren

Die histologische Untersuchung sowie die Befundermittlung fanden im Institut für allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München statt.

Bei den Referenztieren waren sich die Glomerula durchgehend ohne besonderen Befund (siehe Abbildung 32 B). Im Bereich der proximalen Tubuli fanden sich bei diesen Tieren in allen Fällen eine geringgradige Vakuolisierung und Degeneration der proximalen Tubulusepithelzellen (siehe Abbildung 32 C) sowie eine tubuläre Dilatation und eine intraluminale Akkumulation von proteinreichem (hyalinem) Material. Diese Befunde wurden als normale Hintergrundbefunde definiert. Jeweils eines der Referenztiere zeigte eine geringgradige Ansammlung von intrazytoplasmatischen Granula im Bereich der proximalen Tubulusepithelzellen sowie eine geringgradige Dilatation und Degeneration der distalen Tubulusepithelzellen, sodass es sich auch bei diesen Befunden um mögliche Hintergrundbefunde handeln kann.





**Abbildung 32: Histologische Normal- bzw. Hintergrundbefunde der Nieren der Mäuse der Referenzgruppe**

In der Übersicht (A) erkennbare normale Nierenmorphologie mit unauffälligen Glomerula (B). Es fanden sich vereinzelt geringgradige Vakuolisierungen (Pfeil) und Epitheldegenerationen mit Karyolyse (Pfeilspitze) im Bereich der proximalen Tubuli (C); (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Übersicht (A) bzw. 40-fache Vergrößerung (B,C))

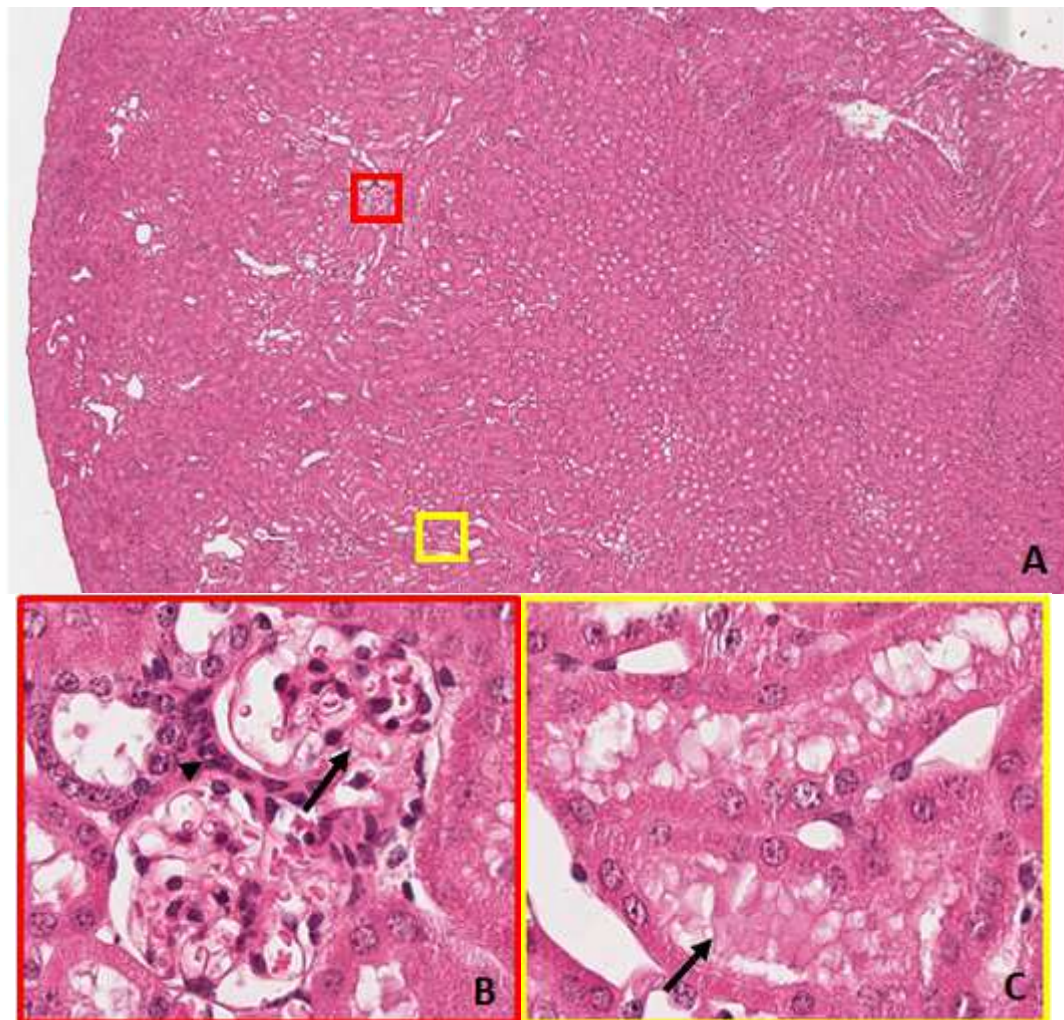
Bei den mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC therapierten Mäusen fanden sich in beiden Therapiegruppen in unterschiedlichen Ausprägung Alterationen insbesondere im Bereich der Glomerula sowie der proximalen Tubuli (in der NaCl-Therapiegruppe in ca. der Hälfte der Tiere und in der iRGD-Therapiegruppe in über 75 % der Tiere). Eine morphologisch erkennbare Schädigung im Bereich der distalen Tubuli fand sich in beiden Therapiegruppen bei etwa einem Drittel der Tiere.

Die Glomerula wiesen bei den meisten Tieren ein gering- bis mittelgradiges mesangiales Ödem auf mit zumindest partieller Verlegung des Bowmanschen



Kapselraumes. Bei zahlreichen Tieren fand sich des Weiteren eine gering- bis mittelgradige Hypertrophie und/oder Hyperplasie der Podozyten und der Parietalzellen (siehe Abbildung 33 B).

Die Epithelzellen der proximalen Tubuli zeigten bei vielen Tieren eine im Vergleich zu den Befunden bei den unbehandelten Tieren geringgradig verstärkte Vakuolisierung begleitet von epithelialer Degeneration (siehe Abbildung 33 C). Damit einhergehend waren häufiger Dilatationen der proximalen Tubuli nachweisbar. Auch eine intraluminal Akkumulation von proteinreichem Material sowie intrazytoplasmatische Granula fanden sich häufiger als in der Referenzgruppe.



**Abbildung 33: Histopathologische Befunde in den Nieren nach erfolgreicher Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im Therapieversuch III**

Bei erhaltener Nierenstruktur (A) fanden sich degenerative Nierenveränderungen, die sich im Bereich der Glomerula (B) vorwiegend als mesangiale Ödematisierung (Pfeil) und Hypertrophie und -plasie der Podozyten und Parietalzellen (Pfeilspitze) ausprägen. In den proximalen Tubuli (C) fand sich eine vermehrte Proteinausscheidung in die Tubuluslumina hinein (Pfeil); (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Übersicht (A) bzw. 40-fache Vergrößerung (B,C))

Eine Entzündungszellinfiltration war lediglich bei einem Tier in geringgradig verstärktem Maß nachweisbar.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich nach der Therapie mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC degenerative Nierenveränderungen vorwiegend im Bereich der Glomerula sowie der proximalen Tubulusepithelien nachweisen ließen, wobei die Alterationen bei kombinierter Verabreichung mit iRGD etwas häufiger zu beobachten waren als ohne iRGD.

## V. DISKUSSION

Die Behandlung von inoperablen und metastasierten neuroendokrinen Neoplasien (NEN) mit radioaktiv gekoppelten Somatostatinanaloga gehört zu den neueren Therapieoptionen. Für die Behandlung gut differenzierter gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET) stellte sich die Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, mit der gezielten Ansteuerung der auf den NET und deren Metastasen überexprimierten Somatostatinrezeptorsubtyp *ssr2*, als erfolgsversprechender dar als eine Behandlung mit Zytostatika (Kwekkeboom et al., 2010). Im Allgemeinen gilt die Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) als sichere und nebenwirkungsarme Therapiemöglichkeit. Dennoch bestehen dosislimitierende Faktoren. Sie betreffen in erster Linie toxische Effekte auf Nieren und Knochenmark (Forrer et al., 2007). Daher sehen Behandlungsprotokolle in der klinischen Anwendung eine fraktionierte Verabreichung der Radiotherapeutika vor (Rinke & Arnold, 2014). Um die Nierenbelastung im Speziellen zu minimieren, existieren diverse Protokolle zur Verabreichung nierenprotektiver Aminosäurelösungen während der PRRT (Zaknun et al., 2013). Im direkten Vergleich von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE zeigte ersteres ein günstigeres Verhalten für Nieren und Milz, mit einer kürzeren Verweildauer in diesen Organen, jedoch auch eine niedrigere Dosis im Tumor (Esser et al., 2006).

Wie sich in präklinischen Studien zeigte, verspricht die Koadministration des iRGD-Peptids mit diversen Zytostatika einen anderen innovativen, vielversprechenden Ansatz zur gezielten Therapie von Tumoren. Es ermöglicht ein direktes Eindringen des Therapeutikums in die Tumorzelle und bewirkt dessen spezifische und erhöhte Anreicherung im Tumorgewebe (Sugahara et al., 2009).

### Überlegungen und Vorgehensweise zu der vorliegenden Studie

In Anbetracht der Tatsache, dass  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in der Anwendung schonender speziell für die Nieren und auch die Milz zu sein scheint, jedoch gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE den Nachteil der geringeren Anreicherung im Tumor aufweist, wäre  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC die bessere Therapiealternative, sofern es gelänge, die Tumoranreicherung zu erhöhen und dabei dessen Vorteile zu erhalten. Im

Hinblick auf die überzeugenden Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Sugahara und Ruoslahti (2009, 2010), die durch die kombinierte Gabe von Zytostatika wie Doxorubicin, Abraxane oder auch des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab mit iRGD eine vielfach erhöhte Anreicherung der Therapeutika im neoplastischen Gewebe erreichen konnten, generierte sich die Überlegung, die Eigenschaften des iRGD auch für den Einsatz in der PRRT mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zu erproben (Sugahara et. al., 2009; Sugahara et al., 2010).

#### Auswahl der Zelllinien mit erforderlichen Eigenschaften

Die Zelllinien, die in dieser Studie Anwendung fanden, mussten bestimmte Kriterien erfüllen. Zum einen mussten sie neuroendokrine Merkmale aufweisen. Für die Eingruppierung als neuroendokrine Neoplasie ist die Bildung der neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Synaptophysin ausschlaggebend (Klöppel, 2011). Das Expressieren von Somatostatinrezeptoren sstr2 und sstr5 auf der Zelloberfläche stellte eine essentielle Voraussetzung für den Einsatz des therapeutischen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC dar (Reubi et al., 2000). Zudem war es in Hinblick auf das Studienziel wichtig, dass die Zellen beim Subkultivieren ihre Eigenschaften nicht verlieren. Diese Voraussetzungen wurden von der amphikrinen Zelllinie AR42J (Azaserin-induziertes Pankreaskarzinom der Ratte) und der NCI-H69-Zelllinie (humanes neuroendokrines kleinzelliges Lungenkarzinom) zuverlässig erfüllt (siehe II. 1.7). Eine anfangs noch zur Auswahl stehende Zelllinie stellten die MIA PaCa-2, Zellen des humanen Pankreasadenokarzinoms mit neuroendokrinen Eigenschaften, dar (Gradiz et al., 2016). Aufgrund unterschiedlicher Angaben in der Literatur hinsichtlich des Somatostatinrezeptorvorkommens wurden die Zellen mittels „fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) im Helmholtz Zentrum München auf die wesentlichen sstr2- und sstr5- Rezeptoren hin überprüft (Gillespie et al., 1992; Taylor et al., 1994; Fisher et al., 1996; Gradiz et al., 2016). Sie stellten sich als negativ für sstr2 und nur sehr schwach positiv für sstr5 dar (siehe Anhang Tabelle 31). Diese Tatsache bedeutete den Ausschluss für diese Zelllinie. Eine weitere neuroendokrine Zelllinie, die sog. BON1, mit Ursprung aus einer Metastase eines humanen Pankreaskarzinoids, wurde aufgrund des ungewissen Status der zur Verfügung stehenden Zellen ebenfalls im Hinblick auf besagte Somatostatinrezeptoren mittels FACS-Analyse überprüft (Evers et al., 1994).

Auch hier stellte sich ein nur unbefriedigendes Ergebnis bezüglich des Rezeptorvorkommens heraus, wodurch auch diese Zelllinie ausschied (siehe Anhang Tabelle 32). Die Anwesenheit der Integrine  $\alpha\beta 3$  geht mit einer tumorinduzierten Neoangiogenese einher (Strömblad & Cheresh, 1996; Eliceiri & Cheresh, 1998; Ruoslahti, 2002). Zudem wurde die Anwesenheit jener Integrine mittels  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD Scans im  $\mu\text{PET}$  überprüft (siehe IV. 2.).

### Wahl des Tumormodells

Für diese Studie war die Verwendung eines Mausmodells notwendig, da die Evaluierung der komplexen Vorgänge und möglichen pathologischen Veränderungen ein physiologisches System verlangte. Die Wahl fiel dabei auf die SHO-Mauslinie, da diese eigens für onkologische Studien gezüchtete immunsupprimierte Mauslinie ein zuverlässiges Tumorwachstum garantiert (siehe III. 8.1). In Anbetracht der Verwendung der AR42J-Zelllinie, die ihren Ursprung in der Ratte hat, stand auch die Überlegung im Raum, bei den eingesetzten Versuchstieren und der Zelllinie möglichst speziesintern zu bleiben. Der Einsatz der höher entwickelten Spezies Ratte stellte jedoch keine Notwendigkeit dar, da die grundlegenden Fragestellungen auch durch Versuche mit den auf einer niedrigeren Entwicklungsstufe stehenden Mäusen zu klären waren.

Der Entscheidung, ob ein orthotopes oder subkutaner Modell verwendet wird, ging die Abwägung verschiedener Vor- und Nachteile dieser zwei Modelle voraus. Oberste Priorität hatte, dass die Belastung der Mäuse auf das absolut notwendige Maß begrenzt wird. Bei einer klinknah angelegten Studie wäre vorzugsweise ein orthotopes Modell zu wählen gewesen. Solch ein Modell hat die Vorteile realistischerer pathologischer Bedingungen wie die der organspezifischen Lokalisation und Blutversorgung der Herkunftszellen, die eines möglichen invasiven Tumorwachstums, der Metastasierung sowie die der neoplasiespezifischen pathologischen Symptomatik (Stelter et al., 2007). Dies würde jedoch auch eine deutlich höhere Belastung für die Tiere bedeuten. Zudem müsste ein invasiver Eingriff zur Platzierung der Zellen erfolgen (Stelter et al., 2007). Zur Darstellung orthotop platzierter AR42J-Tumoren entwickelten Stelter und Mitarbeiter (2007) ein kombiniertes Imaging-Modell aus  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC- $\mu\text{PET}$ -Scans und MRI (Stelter et al., 2007). Jene Überwachungsmethode für die

Tumorgenese setzt allerdings den regelmäßigen Zugang zu beiden Geräten voraus. Zudem würde sie sich sehr aufwendig gestalten und eine größere Belastung für die Mäuse bedeuten, da diese regelmäßig über einen längeren Zeitraum in Narkose gelegt werden müssten. Ungeachtet der zusätzlichen Belastung für die Mäuse sind die  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC- $\mu\text{PET}$ -Scans bei einer größeren Anzahl an Mäusen schwierig zu verwirklichen, da je Synthese des  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC bei einer Halbwertszeit des Radionuklids von 68 min erfahrungsgemäß höchstens 4 Mäuse mit der erforderlichen Aktivitätshöhe in einem tierschutzkonformen Applikationsvolumen zu scannen wären. Außerdem würden die Schwanzvenen, über welche die Tracerapplikation erfolgen muss, neben den Applikationen der Therapieaktivität und des Tracers für die  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien sehr geschädigt, wodurch die Gefahr bestehen würde, eventuell keinen zweiten Therapiezyklus mehr verabreichen zu können oder die posttherapeutischen Nierenszintigraphien nicht mehr möglich wären.

Die Therapie begleitende Überprüfung der Nierenfunktion mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien war ein wichtiger Aspekt dieser Studie. In Anbetracht einer zu vermutenden größeren Belastung der Mäuse bei einem orthotopen Tumormodell bei den relativ aggressiv wachsenden AR42J-Tumoren und den eingeschränkten Möglichkeiten hinsichtlich der Überwachung des Tumorwachstums war zu befürchten, dass notwendige posttherapeutische  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien aufgrund eines früheren Erreichens der Abbruchkriterien nicht mehr möglich gewesen wären.

Bei 4 Mäusen, die für die Biodistributionsstudie mit NCI-H69-Zellen eine subkutane Zellinjektion erhielten, entwickelte sich der Primärtumor unerwartet in der Lunge anstatt an der Flanke, was einem orthotopen Modell bzw. einem Metastasenmodell gleichkäme. Diese Tiere fielen durch Blässe und Atemprobleme auf. Sie wurden aufgrund dieser Symptomatik euthanasiert. Bei der anschließenden Obduktion wiesen die Lungen kaum noch eine physiologische Lungenstruktur auf. Somit würde ein orthotopes Modell mit den NCI-H69-Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms eine unverhältnismäßige große Belastung für die Tiere bedeuten. Zudem wäre keine Narkotisierung der Tiere möglich, da die Sauerstoffversorgung sehr eingeschränkt wäre und die große Gefahr bestünde, hohe Tierverluste aufgrund von Kreislaufversagen verzeichnen zu müssen.

Die grundlegenden Fragestellungen dieser Studie hinsichtlich der effektiveren Wirkung der Therapie durch die zusätzliche Injektion von iRGD sowie der toxischen Auswirkungen der Therapie, im Speziellen auf die Nieren und auch auf das Knochenmark, können auch mit einem weniger belastenden subkutanen Tumormodell untersucht werden. Tumoren müssen ab einem Durchmesser von 1 bis 2 mm für eine effektive Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen auf eine eigene Blutversorgung umstellen (Kusewitt & Rush, 2009). Erfolgt besagte Neoangiogenese kann von der Anwesenheit der Integrin-Rezeptoren  $\alpha v \beta 3$  ausgegangen werden (Strömblad & Cheresch, 1996; Eliceiri & Cheresch, 1998; Ruoslahti, 2002). In diversen Studien zur Wirksamkeit der PRRT mit  $^{177}\text{Lu}$  gekoppeltem DOTATOC oder DOTATATE wurden subkutane Tumormodelle mit den Zelllinien AR42J und NCI-H69 erfolgreich angewendet (Schmitt et al., 2004; Miederer et al., 2008; Erlandsson et al., 2011; Graf et al., 2014). Eine Biodistributionsstudie mit subkutanen NCI-H69-Flankentumoren zeigte beispielsweise, dass die Tumoren die höchste Aktivitätsanreicherung aufwiesen verglichen mit allen anderen untersuchten Geweben (Schmitt et al., 2003). Akashi und Mitarbeiter (2014) verwendeten in ihrer Therapiestudie Gemcitabin in Koadministration mit iRGD ebenfalls bei subkutanen Modellen (Akashi et al., 2014). Bei einer weiteren präklinischen Studie mit dem Einsatz einer iRGD-modifizierten Doxorubicin-Liposom-Kombination wurde ein subkutanes Modell mit Melanomzellen eingesetzt (Yu et al., 2013).

Bei subkutanen Tumoren der Zelllinien AR42J und NCI-H69 wurde die intravenöse Applikation von 30–45 MBq von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC oder  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in verschiedenen Applikationsschemata als therapeutisch wirksam beurteilt (Schmitt et al., 2004; Erlandsson et al., 2011; Graf et al., 2014). Die intraperitoneale Verabreichung von  $^{177}\text{Lu}$  muss stets aufgrund der Toxizität auf eine maximale Aktivität von 16,6 MBq begrenzt werden, wie Koppe et al. (2004) empfehlen. Aus diesem Grund war die intravenöse Applikation der bei subkutanen Tumoren als therapeutisch wirksam geltenden Aktivitätshöhe notwendig. Die Tracer für die dynamischen  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien und die geplanten statischen bzw. dynamischen  $^{68}\text{Ga}$ - $\mu\text{PET}$ -Scans erforderten ebenfalls eine intravenöse Applikation. Diese bevorstehenden intravenösen Applikationen bedeuteten eine hohe Beanspruchung der erfahrungsgemäß ohnehin sehr labilen Venen der eingesetzten Nacktmäuse.

Zur Schonung der Schwänze und Schwanzvenen der Mäuse wurde das wiederholt zu verabreichende iRGD-Peptid i. p. injiziert. Diese Form der Verabreichung von Substanzen stellt eine legitime Alternative zur intravenösen Applikation dar (GV-SOLAS, 2010). Akashi und Mitarbeiter (2014) verabreichten in ihrer Studie iRGD i. v. und 10 min später das Zytostatikum Gemcitabin i. p. (Akashi et al., 2014). Bei der intraperitonealen Applikation ist neben der Vermeidung einer Verletzung innerer Organe die langsamere Absorption, die im Vergleich zur intravenösen Applikation zwei- bis viermal so lange dauert, zu berücksichtigen (Woodard, 1965; Diehl et al., 2001). Das iRGD-Peptid entfaltet seine internalisierende Wirkung für etwa 1 h. Nach 30 min nach intravenöser Applikation weist es seine höchste Aktivität auf. Die rasche Ausscheidung des Peptids über den Urin ist hauptsächlich verantwortlich für dessen kurze Halbwertszeit (Teesalu et al., 2013). Der zu erwartende verzögerte Wirkungseintritt des iRGD bei einer intraperitonealen Applikation wurde mit der Verabreichung des Peptids 1 h vor der intravenösen Applikation des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC berücksichtigt. Die in den Therapieversuchen I bis III angewendeten iRGD-Regime wurden dahingehend modifiziert, dass sowohl der längeren Absorptionsdauer als auch einer eventuell verringerten Anreicherung im Tumorgewebe aufgrund der intraperitonealen Applikation des iRGD Rechnung getragen wurde.

#### $\mu$ PET-Messungen mit $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD zur Darstellung der $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine

Die exemplarisch mit  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD im  $\mu$ PET gemessenen Mäuse mit AR42J- und NCI-H69-Flankentumoren wiesen eine vermehrte Anreicherung des Tracers in den Tumoren auf (siehe IV 2., Abbildung 13). Das Anreicherungsverhältnis zwischen Tumor und kontralateralen Seite von  $3,2 \pm 1,5$  bei den AR42J-Tumoren und  $2,3 \pm 1,1$  bei den NCI-H69-Tumoren bestätigte die Anwesenheit von  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinen, sodass beide Zelllinien die Voraussetzungen hinsichtlich ihres Rezeptoraufkommens für den Einsatz in den folgenden Versuchen erfüllten (siehe dazu auch II. 1.7). Die  $\mu$ PET-Bilder passten auch zum Erscheinungsbild der AR42J-Tumoren, die sich auch in natura als sehr gut durchblutete Tumoren mit einer ausgeprägten und früh einsetzenden Neoangiogenese darstellten (siehe IV. 1.1, Abbildung 11) sowie zu den NCI-H69-Tumoren mit nur mäßiger Neoangiogenese und häufigen Nekrosen in der Tumormitte (siehe IV. 1.2, Abbildung 12).



### Biodistribution und Dosimetrie an NCI-H69-tumortragenden Mäusen

Die Biodistributionsuntersuchung tumortragender Mäuse wurde zur Evaluierung der Anreicherung und Verteilung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in Tumoren und Nieren vorgenommen. Sie sollte eine erste Einschätzung darüber ermöglichen, welche Wirkung die Koadministration von iRGD, im Vergleich zu isotonischer NaCl-Lösung, auf die Anreicherung und Verweildauer des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im Tumorgewebe und in den Nieren hat. Nachdem bei Radionukliden mit längerer Halbwertszeit, wie bei  $^{177}\text{Lu}$ , die Länge ihrer Verweildauer auch die Höhe der Dosis im Gewebe bestimmt, sind zur dosimetrischen Berechnung die späteren Zeitpunkte ausschlaggebend (Esser et al., 2006). Für die therapeutische Wirksamkeit im Tumor ist eine längere Verweildauer wünschenswert (Esser et al., 2006). Die Empfehlung für eine aussagekräftige Nierendosimetrie in der Humanmedizin geht nach einer Studie von Delker und Mitarbeitern (2015) ebenfalls dahin, spätere Zeitpunkte zu wählen. In dieser Studie wurden neben 1 h nach der Administration von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h gemessen (Delker et al., 2015). In Anlehnung an diese Studie sowie an die verwendeten Messzeitpunkte 24 h, 72 h und 168 h nach der Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in der Biodistributionsstudie von Schmitt und Mitarbeitern (2003) an NCI-H69-tumortragenden Mäusen, fiel die Entscheidung auf die Messzeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h nach der intravenösen Verabreichung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC für die hier vorliegende Biodistributionsstudie mit anschließender Dosimetrie für Nieren und Tumoren. Frühere Zeitpunkte sind v. a. für die Eliminationsgeschwindigkeit aus dem Blut und die Ausscheidung mit dem Urin von Interesse (Esser et al., 2006). An Ratten generierte Daten zeigten, dass das Blut innerhalb der ersten Stunde nach Aktivitätsapplikation nur noch ca. 2 % der injizierten Aktivität aufwies (Lewis et al., 2001). Beim Menschen wurden hierzu Werte von unter 10 % der injizierten Aktivität innerhalb der ersten 3 h generiert (Esser et al., 2006). Erwartungsgemäß war auch in der vorliegenden Studie in beiden Gruppen nach 24 h keine relevante Aktivität im Blut mehr nachweisbar.

Die Aktivität in den Nieren war mit  $6,485 \pm 1,044 \text{ \%ID/g}$  in der NaCl-Gruppe und  $4,461 \pm 0,940 \text{ \%ID/g}$  in der iRGD-Gruppe zum Zeitpunkt 24 h mit Abstand am höchsten. Die beiden Gruppen zeigten mit  $p = 0,083$  keine signifikanten Unterschiede. Es folgte ein starker Abfall zum Messzeitpunkt 48 h mit nur noch

1,995  $\pm$  0,167 %ID/g (NaCl-Gruppe) und 1,847  $\pm$  0,388 %ID/g (iRGD-Gruppe). Zu den späteren Messzeitpunkten (48 h und 72 h p. i.) glichen sich die Werte beider Gruppen auf ein relativ ähnliches Niveau an (siehe IV. 3.1.1, Tabelle 7).

Die Tumoren wiesen zu jedem Zeitpunkt nur eine geringe Anreicherung auf, mit geringfügig höheren Werten für die iRGD-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe. Verglichen mit den Ergebnissen der Studie von Schmitt und Mitarbeitern (2003), bei der dieselbe Tumorzelllinie verwendet worden war, lagen die Werte in der aktuellen Studie mit 0,497  $\pm$  0,233 %ID/g in der NaCl-Gruppe und 0,597  $\pm$  0,132 %ID/g in der iRGD-Gruppe nach 24 h bzw. entsprechend 0,216  $\pm$  0,044 %ID/g und 0,245  $\pm$  0,071 %ID/g nach 72 h in beiden Gruppen weit unter der zu erwartenden Anreicherung. Anders als in der vorliegenden Studie verwendeten Schmitt und Mitarbeiter (2003) anstatt  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC allerdings  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE. Das Tumor-Muskel-Verhältnis wies mit Faktoren im Mittel zwischen 30  $\pm$  21 und 56  $\pm$  14 (siehe IV. 3.1.1, Tabelle 7) zwar eine gewisse Mehranreicherung in den Tumoren im Vergleich zum neutralen Gewebe auf. Verglichen mit dem Tumor-Muskel-Verhältnis, das bei den AR42J-Tumoren zu den entsprechenden Zeitpunkten zwischen 367  $\pm$  140 und 731  $\pm$  247 (siehe IV. 3.2.1 Tabelle 9) lag, erschien dies jedoch als allgemein deutlich zu niedrig.

Bei den generierten %ID/g für die Nieren bzw. den Tumor zeichneten sich nur tendenzielle Abweichungen zwischen den beiden Gruppen ab. Die einzelnen Werte wiesen zudem eine hohe Streuung auf, weshalb die generierten Mittelwerte vorsichtig zu interpretieren sind. Es lässt sich dennoch generell sagen, dass für die Nieren, v. a. zum Zeitpunkt 24 h, eine geringere Anreicherung in der iRGD-Gruppe vorlag als in der NaCl-Gruppe. Enttäuschend war die für beide Gruppen unerwartet geringe Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe. Dies könnte in Zusammenhang mit der mangelhaften Durchblutung der Tumoren stehen (siehe IV. 1.2, Abbildung 12). Zum einen gelangt dadurch weniger i. v. applizierte Aktivität in das Tumorgewebe. Zum anderen waren, wie auch die  $\mu\text{PET}$ -Bilder zeigten (siehe IV. 2., Abbildung 13), weniger Oberflächenintegritäten als bei den AR42J-Tumoren zu vermuten, wodurch eine verstärkende Wirkung durch iRGD nur mangelhaft stattfinden konnte. Die Größe der Tumoren variierten sehr, was eine unterschiedliche Ausprägung an Nekrosen innerhalb der Tumoren vermuten ließ. Aus diesem Grund war eine einheitliche Anreicherung im Tumorgewebe unwahrscheinlich (siehe IV. 1.2, Abbildung 12). Diese Größenvariabilität fand

sich auch bei der Studie von Schmitt und Mitarbeitern (2003). Deren Feststellung ging dahin, dass der kleinste Tumor im Verhältnis zur Tumorgroße die meiste Aktivität anreicherte (Schmitt et al., 2003). Wie Esser und Mitarbeiter (2006) im direkten Vergleich zwischen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE bereits feststellen konnten, betrug die Verweildauer im Tumor von Letzterem im Schnitt doppelt so lange, was zu einer höheren Anreicherung und Dosis im Tumor führte (Esser et al., 2006). Zudem wurde in dieser Studie die höhere Affinität von DOTATATE zu sstr2 auch in Kombination mit  $^{177}\text{Lu}$  bestätigt (Reubi et al., 2000; Esser et al., 2006). Eventuell lässt sich die stärkere Anreicherung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE in der Biodistributionsstudie von Schmitt und Mitarbeitern (2003) trotz ähnlicher Tumorbedingungen wie in der vorliegenden Studie mit eben diesen Tatsachen erklären. Die Koadministration von iRGD konnte im Falle der NCI-H69-Tumoren aufgrund der mangelhaften Durchblutung und zu geringer Expression der  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine keine Angleichung der Anreicherungshöhe des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC an die des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE bewirken. Ein Fehlen bzw. zu geringes Vorhandensein der essentiellen Somatostatinrezeptoren kann ausgeschlossen werden, da die NCI-H69-Zelllinie dahingehend mittels FACS-Analyse im Helmholtz Zentrum überprüft und als positiv für sstr2 und sstr5 eingestuft worden war (siehe Anhang Tabelle 30).

Eine dosimetrische Berechnung wurde für Nieren und Tumoren generiert. Vergleicht man die Dosiswerte der zwei Gruppen miteinander, so bot die Koadministration von iRGD einen geringfügigen Vorteil von 4 % in Bezug auf die Dosishöhe im Tumor und eine um 20 % verringerte Dosis für die Nieren (siehe IV. 3.1.2, Tabelle 8). Da die Dosisberechnungen auf den generierten Werten der %ID/g basierten und jene eine große Streuung aufwiesen, sind auch die Prozentangaben mit Vorsicht zu interpretieren. Zudem differierten die eigentlichen Dosiswerte [Gy/MBq] zwischen beiden Gruppen sowohl für die Tumoren als auch für die Nieren nur geringfügig (siehe IV. 3.1.2, Tabelle 8).

Die Biodistributionsuntersuchung bei den Nieren und Tumoren der NCI-H69-tumortragenden Mäuse ergab für keinen Wert zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Augenscheinlich scheint die geringere Anreicherung in den Nieren in der iRGD-Gruppe nach 24 h das Anreicherungsverhalten in den Nieren zugunsten dieser Gruppe zu verschieben, wenngleich erwähnt werden muss, dass die Anreicherung in diesen Organen

verglichen mit der Studie von Schmitt und Mitarbeitern (2003) als recht hoch zu interpretieren ist. Die Anreicherung im Tumorgewebe stellte sich in beiden Gruppen als so gering dar, dass eine scheinbar vorteilhaftere Anreicherung und günstigere Dosimetrie für die iRGD-Gruppe fraglich erscheint.

Die hier generierten Ergebnisse hinsichtlich der Aktivitätsanreicherung in [%ID/g] in beiden Gruppen und der niedrigen Werte in der Dosimetrie von 0,037 Gy/MBq in der NaCl-Gruppe und 0,039 Gy/MBq in der iRGD-Gruppe lassen auf keinen therapeutischen Erfolg mit einer Therapieaktivität zwischen 30 und 50 MBq pro Maus und Therapie bzw. Therapiezyklus hoffen. Schmitt und Mitarbeiter (2003) haben mit  $0,29 \pm 0,06$  Gy/MBq im Vergleich zur vorliegenden Studie eine 7-fach höhere Tumordosis errechnet und in einer folgenden Therapiestudie mit selbiger Tumorzelllinie mit der zweimaligen Verabreichung von 45 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE innerhalb von 48 h erfolgreich eingesetzt (Schmitt et al., 2004). Hieraus ist ersichtlich, dass der Einsatz dieser Zelllinie in einem Therapieversuch, um ähnliche Effekte zu erzielen, eine deutlich höhere Dosierung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC erfordern würde, als in dieser Studie zugunsten der Nierenfunktion geplant war.

Zusätzlich ergaben sich noch Erfahrungen hinsichtlich des Tumorwachstums bei der Maus. Dieses stellte sich mit einer mangelhaften Anwachsrate der Zellen bei nur 70 % der injizierten Mäuse und dem Auftreten der Tumoren zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten als schlecht planbar dar. Die Tatsache, dass nur selten mehrere Mäuse gleichzeitig ein beginnendes Tumorwachstum aufwiesen, führte dazu, dass die Tumoren, bei Erreichen einer für die Studie notwendigen größeren Anzahl an tumortragenden Mäusen, sehr unterschiedliche Größen aufwiesen. Der Grund hierfür könnte in dem Verhalten der Zellen in Kultur liegen. Die Zellen wachsen in überlebensnotwendigen Aggregaten, sodass vermutlich den diversen Mäusen unterschiedlich große Zellaggregate injiziert wurden, da nur die Aggregate in dem Teil der Zellsuspension aufgebrochen wurden, der zur Zellzählung in Verdünnung gegeben wurde. Diese Unzuverlässigkeit im Wachstum macht diese Zelllinie ungeeignet für systematische Studien. Zwar bestünde die Möglichkeit für die Therapiestudien, Tumorstücke aus Spendermäusen in andere Mäuse subkutan zu implantieren, jedoch würde dies wiederum eine größere Belastung für die Mäuse bedeuten.

Aufgrund der negativen Wachstumseigenschaften und der mangelhaften Aktivitätsanreicherung wurde diese Zelllinie als ungeeignet für diese Therapiestudie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC beurteilt.

#### Biodistribution und Dosimetrie an AR42J-tumortragenden Mäusen

Für die Biodistribution hinsichtlich des Anreicherungsverhaltens von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC mit anschließender Dosimetrie für Nieren und AR42J-Tumoren wurden zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h p. i. zusätzlich noch die Werte zu den Zeitpunkten 120 h und 168 h erfasst. Das Hinzufügen zweier weiterer Messzeitpunkte geschah in Absprache mit der Abteilung für Physik der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin und sollte für die Beobachtung hinsichtlich der Anreicherung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und für dessen dosimetrische Berechnung zusätzliches Datenmaterial generieren. Auch in anderen Biodistributions- bzw. Dosimetriestudien wurden ähnliche oder dieselben Messzeitpunkte nach Applikation der Aktivität über 72 h hinaus gewählt (Lewis et al., 2001; Schmitt et al., 2003; Esser et al., 2006).

Vorab sei erwähnt, dass diese Zelllinie ein wesentlich zuverlässigeres Wachstumsverhalten zeigte als die NCI-H69-Zellen. Bei allen inokulierten Mäusen wuchsen Tumoren. Das Wachstum setzte hierbei nahezu gleichzeitig ein. Zwölf Tage nach erfolgter Zellinokulation waren bei allen Mäusen weitestgehend einheitlich große Tumoren mit einer sichtbaren Gefäßversorgung vorhanden und konnten für die Biodistribution eingesetzt werden.

Die AR42J-Tumoren zeigten mit  $7,540 \pm 0,555$  %ID/g in der NaCl-Gruppe und  $8,158 \pm 0,535$  %ID/g in der iRGD-Gruppe nach 24 h eine 13- bis 15-fach höhere Anreicherung als die NCI-H69-Tumoren. An den folgenden Messtagen halbierte sich der Wert in etwa jeweils, im Vergleich zum vorherigen Messwert. An den ersten beiden Zeitpunkten lagen die Werte der iRGD-Gruppe über jenen der NaCl-Gruppe. Das Tumor-Muskel-Verhältnis ergab nach 24 h sogar noch einen signifikant höheren Faktor in der iRGD-Gruppe (siehe IV. 3.2.1, Tabelle 9). Dies wies darauf hin, dass das 1 h zuvor i. p. injizierte iRGD zum Zeitpunkt der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC-Injektion bei ausreichender Durchblutung seine Wirkung am Tumorgewebe entfalten kann. Hierzu stellt sich die Frage, wie das iRGD bei einer postulierten Wirkdauer von 1 h zu so späten Zeitpunkten nach erfolgter Injektion noch, wenn auch nicht signifikant, Wirkung zeigen kann. Eine mögliche

Erklärung hierfür könnte sein, dass das iRGD aufgrund der intraperitonealen Applikation nicht so schnell ausgeschieden wurde, was wiederum bei intravenösen Gabe als Grund für dessen kurze Halbwertszeit angeführt wurde (Teesalu et al., 2013). Alle übrigen Unterschiede bezüglich der Werte zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt 24 h waren nur tendenzieller Natur. Im weiteren Verlauf glichen sich die Werte beider Gruppen an (siehe IV. 3.2.1, Tabelle 9). Die allgemein hohe Aktivitätsanreicherung ist, verglichen mit den NCI-H69-Tumoren, vermutlich auf die sehr gute Durchblutungslage (siehe IV. 1.2, Abbildung 11) zurückzuführen und steht aller Wahrscheinlichkeit nach im Zusammenhang mit einer umfangreichen Expression von sstr2 und sstr5. Die weitestgehend einheitlichen Größen der Tumoren zum jeweiligen Zeitpunkt bedingten, dass bei dieser Biodistributionsstudie die Anreicherung weniger von der Größe des einzelnen Tumors abhing als vom Messzeitpunkt.

Die Nierenwerte zeigten mit  $5,461 \pm 1,149$  %ID/g in der NaCl-Gruppe und  $3,532 \pm 0,926$  %ID/g in der iRGD-Gruppe zum Zeitpunkt 24 h ein geringere Aktivitätsanreicherung als das Tumorgewebe zum selben Zeitpunkt. Tumor- und Nierenanreicherung glichen sich erst nach 168 h auf ein ähnliches Niveau an. Zu den vorherigen Messzeitpunkten zeigten sich in den Tumoren stets mehr Aktivität als in den Nieren (siehe IV. 3.2.1, Tabelle 9 und Abbildung 17). Obwohl die Nieren der Mäuse der iRGD-Gruppe nach 24 h weniger Aktivität aufwiesen als in der NaCl-Gruppe, waren die Werte in beiden Gruppen nach 48 h bereits auf fast gleichem Niveau. Auch an den folgenden Tagen blieb das Aktivitätsniveau der Nieren beider Gruppen in etwa gleich (siehe IV. 3.2.1, Tabelle 9). Da auch bei dieser Biodistributionsuntersuchung, trotz der einheitlichen Tumorgößen, die Werte im Einzelnen für Tumoren und Nieren relativ stark streuten, müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden.

Der Effizienzgewinn von 10 % durch iRGD bezüglich der dosimetrischen Berechnung für die Tumoren und einer Verringerung der Nierendosis von fast 4 % zeugen von einem begünstigenden Aspekt des iRGD für den Organismus und die Therapie. Da die Zahlenwerte sowohl für die Tumordosis mit 0,41 Gy/MBq für die NaCl-Gruppe und 0,45 Gy/MBq für die iRGD-Gruppe als auch für die Nierendosis mit 0,095 Gy/MBq in der NaCl-Gruppe und 0,091 Gy/MBq in der iRGD-Gruppe an sich sehr ähnlich ausfielen, müssen die Ergebnisse jedoch auch in diesem Fall vorsichtig interpretiert werden.

Die stets höhere Anreicherung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im Tumorgewebe im Vergleich zu den Nieren, die höhere Anreicherung im Tumor in der iRGD-Gruppe am ersten Tag nach erfolgter Injektion des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC sowie die guten Wachstumseigenschaften der Zellen in der Maus mit garantierter und gleichmäßiger Bildung subkutaner Tumoren sprachen dafür, die AR42J für die folgenden Therapieversuche einzusetzen.

#### Vorüberlegungen zu den Therapiestudien

Der Grundgedanke für die im Rahmen des Promotionsvorhabens umgesetzte Therapiestudie bestand darin, einen kliniknah angelegten Versuchsaufbau zu realisieren. Dabei sollten Antworten in Bezug auf die Frage der Effektivität bzw. Effektivitätssteigerung durch die Koinjektion von iRGD für die Tumorthherapie gefunden werden. Es war oberste Priorität die Belastung für die eingesetzten Mäuse so gering wie möglich zu halten und unter Berücksichtigung möglichst vieler Parameter die Zahl der Tiere auf ein notwendiges Minimum zu reduzieren (3R-Prinzip).

Die Wahl der zu verabreichenden Therapieaktivität zwischen 30 MBq und 45 MBq wurde in der Literatur mit therapeutischem Effekt für  $^{177}\text{Lu}$ -gekoppelten Somatostatinanloga beschrieben (Schmitt et al., 2004; Erlandsson et al., 2011; Graf et al., 2014). Die in Betracht gezogene zu applizierende therapeutische Höhe des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC soll gemäß Ilhan (2013) nur bedingt nephrotoxische Auswirkungen haben. Zum bestmöglichen Schutz der Nieren wurden Therapie begleitend 500 µl einer in der Klinik angewendeten Arginin-Lysin-Aminosäurelösung i. p. verabreicht. Außerdem erhielten die Tiere 500 µl einer isotonischen NaCl-Lösung s. c. als zusätzliche Flüssigkeitssubstitution und zur Verdünnung der Aminosäurelösung, um die Gefahr einer möglichen Übelkeit (Nausea) als Nebenwirkung durch die Bolusinjektion der Aminosäurelösung zu verhindern (Rolleman et al., 2003; Zaknun et al., 2013). In der Klinik sind Abstände von 6 bis 12 Wochen zwischen zwei Therapiezyklen üblich (Rinke & Arnold, 2014). In der vorliegenden Studie war ein Abstand von 3 Wochen zwischen zwei Therapiezyklen angedacht, der den Nieren und dem Knochenmark Zeit zur Regeneration geben und die toxischen Effekte reduzieren sollte.

Die iRGD-Applikation am Tag vor der Therapie sollte die  $\alpha v\beta 3$ -Rezeptoren schon einmal im Voraus aktiviert haben. Die iRGD-Injektion 1 h vor Therapie sollte der verlängerten Absorption aufgrund der intraperitonealen Verabreichung Rechnung tragen. Die Verabreichung des iRGD am Tag nach der Therapie sollte eventuell noch vorhandenem und nicht gebundenem  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC die Möglichkeit eröffnen, noch über die Neuropilin-1-Rezeptoren internalisiert zu werden. Diese Modifikation des iRGD-Verabreichungsregimes war aufgrund des anderen Tumor- und Therapiemodells (siehe oben), im Vergleich zu den Studien von Sugahara und Mitarbeitern (2010), bei denen die Kombination aus Zytostatikum und iRGD jeden Tag verabreicht wurde, notwendig. Zum einen ist die tägliche Verabreichung radioaktiver Somatostatinanaloga bei der PRRT in der klinischen Routine nicht üblich (Rinke & Arnold, 2014). Zum anderen wäre dies aufgrund des toxischen Potentials  $^{177}\text{Lu}$ -gekoppelter Somatostatinanaloga u. a. der Nierengesundheit keinesfalls zuträglich gewesen (Rolleman et al., 2007c; Ilhan, 2013). Dennoch sollte eine ausreichende Aktivierung der  $\alpha v\beta 3$ -Integrine und Neuropilin-1-Rezeptoren gewährleistet werden.

Von den ursprünglich geplanten und in der Klinik zur Detektion von somatostatinrezeptorpositiven Tumoren und deren Metastasen üblichen explorativen  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC-PET-Scans wurde aufgrund des Wissens um das Vorhandensein entsprechender sstr2-exprimierendere subkutaner Tumoren und zur Schonung der Schwanzvenen abgesehen.

#### Applikation der Aktivität über Katheter an narkotisierten Mäusen

Anders als in der Biodistributionsstudie wurde bei den Therapieversuchen das  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC über einen Katheter appliziert (siehe III. 8.3). Die Schwanzvenen der SHO-Mäuse stellten sich als äußerst labil dar. Da die Tiere in den Therapieversuchen pro Therapietag eine deutlich höhere Aktivität als bei der Biodistributionsstudie erhalten sollten, bedeutete dies für die Schwänze der Mäuse eine stärkere Belastung und auch für die therapierende Person eine höhere Strahlenexposition. Erfolgte die Applikation des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC jedoch über einen Katheter an der narkotisierten Maus, so konnte das Legen und die Überprüfung der sicheren intravenösen Platzierung des Katheters geschehen, während sich die Spritze mit dem Radiopharmakon noch hinter der



Bleiabschirmung befand. Die Spritze mit dem  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurde dann nur für die kurze Zeit der Applikation hervorgeholt, sodass die direkte Strahlenexposition der behandelnden Person so kurz wie möglich gehalten werden konnte. Die Fixation des Katheters am Schwanz bei den Nierenszintigraphien musste neben einem Gewebiband aufgrund der notwendigen Manipulation zur dynamischen Applikation des Tracers zusätzlich mit Hautkleber erfolgen (siehe III. 8.3). Durch den Einsatz und das Entfernen des Hautklebers konnte es allerdings trotz allergrößter Sorgfalt zu Irritationen an der Schwanzhaut kommen. Neben der Beeinträchtigung für die Maus ist der Schwanz an entsprechender Stelle demzufolge für weitere intravenöse Applikationen unbrauchbar. Um diese Gefahr auf ein notwendiges Minimum zu beschränken, erfolgte die Fixation mit Hautkleber nur für besagte Scans. Bei der Therapie musste die narkotisierte Maus nicht bewegt werden und die Applikation der Aktivität konnte am Platz erfolgen, sodass es hier ausreichte, den Katheter lediglich mit Gewebiband zu fixieren. Durch die gegebenen Umstände in dieser Studie war diese die sicherste und tierschutzgerechteste Methode, das  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC i. v. zu applizieren.

#### Therapeutische Effizienz: absolute Volumenänderung und Überlebenszeit

Der erste Therapieversuch mit nur einem Zyklus und einer verabreichten Aktivität von  $25 \pm 5$  MBq des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC diente zu einer ersten Einschätzung in Hinblick auf den Wachstumsverlauf der AR42J-Tumoren unter dem Einfluss einer Therapieaktivität, die eine reversible Nierenbeeinflussung erwarten ließ (Ilhan, 2013). Mit den rund 25 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurde sich in einem Bereich der therapeutischen Aktivität bewegt, bei der Graf und Mitarbeiter (2014) mit im Schnitt 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC bei Tumoren derselben Zelllinie eine Wachstumsverzögerung von 15 Tagen im Vergleich zu einer nicht therapierten Kontrollgruppe erzielten (Graf et al., 2014). Bei Eintritt eines verbesserten Effektes in der iRGD-Therapiegruppe, bei einer Therapieaktivität an der unteren Grenze der therapeutischen Wirksamkeit wäre dies bereits bei einer einmaligen Verabreichung hinweisend auf eine verbesserte Wirkung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC durch iRGD.

Im ersten Therapieversuch zeigte sich ein kurzer Wirkungseintritt des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Diese Wirkung schwächte sich aber zwischen Tag 4 und Tag 7

bereits ab und zu diesem Zeitpunkt fand der Umbruch vom therapiebedingten Wachstumsstillstand zum erneuten Einsetzen des Wachstums statt. Zwischen Tag 7 und Tag 12 war ein deutliches Wachstum in beiden Therapiegruppen zu verzeichnen. In beiden Therapiegruppen zeigten die Tumoren ein ganz ähnliches Verhalten, wobei bei Betrachtung der Mittelwerte bis Tag 7 in der iRGD-Therapiegruppe eine tendenziell geringere Volumenänderung der Tumoren stattfand (siehe IV. 4.1.2, Tabelle 11). Bei dieser Einschätzung muss jedoch stets die große Streuung der Werte beachtet werden. Die Tatsache, dass sich 4 Mäuse mit anfänglich nicht messbaren Tumoren in der NaCl-Therapiegruppe befanden, schien dieser Therapiegruppe keine Vorteile erbracht zu haben, nachdem die absolute Volumenänderung in den ersten Tagen nach der Therapie in der iRGD-Therapiegruppe im Mittel tendenziell trotzdem kleiner ausfiel als in der NaCl-Therapiegruppe. Jene nicht messbaren Tumoren behielten in der NaCl-Therapiegruppe ihren Status als nicht messbar bis Tag 4 bzw. Tag 7 und in der Kontrollgruppe bis Tag 4. Das Volumen der vier Tumoren glich sich in der NaCl-Therapiegruppe zwischen Tag 12 und Tag 15 auf gleiches Niveau der von Beginn an messbaren Volumina an. Bei dem Tumor in der Kontrollgruppe erfolgte diese Volumenangleichung bereits zwischen Tag 7 und Tag 12. Aufgrund dieser Volumenangleichung ergab sich keine verlängerte Überlebenszeit für jene Mäuse. Dies zeigte sich darin, dass 3 der 4 Mäuse mit anfänglich nicht messbaren Tumorumfängen aus der NaCl-Therapiegruppe an Tag 22 euthanasiert wurden, wie auch der Großteil der anderen Mäuse in den Therapiegruppen.

Wird der Verlauf der absoluten Volumenänderungen aller drei Gruppen betrachtet, so ergab sich zwar zwischen der jeweiligen Therapiegruppe und der Kontrollgruppe eine Signifikanz durch eine Wachstumstagnation von 4 bis 7 Tagen in den Therapiegruppen, jedoch nicht der erhoffte signifikante Unterschied zwischen der NaCl- und der iRGD-Therapiegruppe (siehe IV. 4.1.2). Gleiches gilt für die Zeit des Überlebens bzw. des Eintretens der Abbruchkriterien hinsichtlich der Tumoren. Dennoch gelang durch die Therapie eine durchschnittliche Überlebenszeitverlängerung von rund 5 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe IV. 4.1.6). Insgesamt ermöglichte das eine Beobachtungszeit der einzelnen Gruppen von nur 3 Wochen. Das Tumorstadium in beiden Therapiegruppen konnte nur bis maximal Tag 7 gebremst werden. Dies entsprach nur etwa der Hälfte der Zeit, die in der Studie von Graf und Mitarbeitern (2014) erreicht wurde.

Dies lässt die Vermutung zu, dass, nachdem der Hauptteil der Aktivität innerhalb der ersten Stunden nach der Therapie ausgeschieden wurde, nach etwa einer Halbwertszeit des verbliebenen  $^{177}\text{Lu}$  von 6 Tagen sowohl in der NaCl- als auch in der iRGD-Therapiegruppe keine ausreichend therapeutisch wirkende Aktivität in den Tumoren mehr vorhanden war.

Aufgrund der nur sehr kurzen Wachstumsstagnation der Tumoren in beiden Therapiegruppen wurde im zweiten Therapieversuch die Aktivität erhöht und ein zweiter Therapiezyklus mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC hinzugefügt. Die positiven Ergebnisse der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie im ersten Therapieversuch schienen eine Erhöhung zuzulassen (siehe IV. 4.1.4). In der Studie von Schmitt und Mitarbeitern (2004) bewirkte die zweimaligen Verabreichung von 45 MBq innerhalb von 48 h den längsten Zeitraum in dem eine Verkleinerung der Tumorumfänge eintrat (Schmitt et al., 2004). Mit der zweimaligen Verabreichung von 50 MBq befand sich die Dosierung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in unserer Studie in jener therapeutisch wirksamen Höhe. Anders als in der Studie von Schmitt und Mitarbeitern (2004) wurde in der vorliegenden Studie eine Pause zur Schonung der Nieren zwischen den Therapiezyklen angesetzt. Die Erhöhung der Aktivität auf 50 MBq je Therapiezyklus sollte eine längere Wachstumsstagnation bzw. eine Verringerung der Tumorumfänge bereits nach dem ersten Therapiezyklus bewirken, sodass zwischen den zwei Therapiezyklen eine Zeit von 3 Wochen eingehalten werden könnte. Gemäß einer Studie von Kölby und Mitarbeitern (2005) soll eine Rezeptorsättigung bei verabreichten 30 MBq des sstr2-spezifischen radioaktiven Somatostatinanalogs  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE eintreten (Kölby et al., 2005). Da in der aktuellen Studie jedoch  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, das zusätzlich Affinität zum Somatostatinrezeptor sstr5 aufweist, in Kombination mit iRGD verwendet wurde, standen hier, neben den sstr2, mit den sstr5 und dem internalisierenden Zusammenwirken der  $\alpha\beta3$ -Integrine mit Neuropilin-1 zwei weitere potentielle Rezeptorsysteme für die Bindung und die Internalisierung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zur Verfügung (Reubi et al., 2000; Hofslı et al., 2002; Waser et al., 2002; Sugahara et al., 2009).

Der zweite Therapieversuch bewirkte auf den ersten Blick einen verbesserten therapeutischen Effekt des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC mit einer Wachstumsstagnation von 16 Tagen im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die in dem der Kontrollgruppe im ersten Therapieversuch ähnliches kontinuierliches Wachstum aufwies. Diese

Wachstumsverzögerung wurde jedoch gleichermaßen in beiden Therapiegruppen festgestellt, wobei auch hier wieder tendenziell die Tumoren in der iRGD-Therapiegruppe die geringeren Volumenänderungen zeigten. Die generierten Mittelwerte sprechen sogar für eine geringfügige Tumolvolumenabnahme in der iRGD-Therapiegruppe (siehe IV. 4.2.2, Tabelle 17). Aufgrund der Streuung der Werte müssen diese jedoch vorsichtig interpretiert werden. Zwei Mäuse mit nicht messbaren Tumoren zu Beginn der Therapie befanden sich dieses Mal in der iRGD-Therapiegruppe. Mit der Anpassung ihrer Volumina auf das Volumenniveau der übrigen Tumoren zwischen Tag 16 und Tag 19 ergab sich für diese Mäuse, wie auch schon im ersten Therapieversuch, kein Vorteil hinsichtlich der Überlebenszeit.

Da ein Wachstum der Tumoren nach erfolgtem ersten Therapiezyklus trotz der höheren Dosierung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in beiden Therapiegruppen zum selben Zeitpunkt wie im ersten Therapieversuch einsetzte und damit früher als erwartet, musste von dem ursprünglich geplanten Zeitraum von 3 Wochen zwischen den beiden Therapiezyklen abgesehen werden. Der Zeitraum zwischen den beiden Therapiezyklen musste aufgrund des ähnlichen Wachstumsverhaltens der Tumoren aus dem ersten Therapiezyklus auf 8 Tage reduziert werden, da bei einer dreiwöchigen Therapiepause ein Tumolvolumen von ca.  $800 \text{ mm}^3$  zu erwarten gewesen wäre. Ein solches Volumen ließe nekrotische Bereiche im Tumor befürchten, die den therapeutischen Effekt aufgrund mangelhafter Durchblutung stark beeinflussen würden, da zum einen der Transport des Radiopharmakons eingeschränkt wäre und zum anderen aktive, Neoangiogenese betreibende Tumoren für die Anwesenheit der  $\alpha\beta 3$ -Integrine und Neuropilin-1-Rezeptoren erforderlich waren.

Durch den zweiten Therapiezyklus konnte ein Rückgang der Tumolvolumina verzeichnet werden, wobei dieser in der iRGD-Therapiegruppe wieder tendenziell größer ausfiel. Ein deutliches Wachstum setzte schließlich zwischen Tag 16 und 19 ein. Diese Ergebnisse entsprechen zeitlich jenen aus dem ersten Therapieversuch, nur mit Verzögerung auf einen späteren Zeitpunkt. Dieses zeitverzögerte Einsetzen des Wachstums war jedoch vermutlich nicht der höheren Aktivität geschuldet, sondern des angewendeten zweiten Therapiezyklus. Der Zugewinn für die Überlebenszeit durch den zweiten Therapiezyklus in den beiden Therapiegruppen betrug etwa 4–5 Tage im Vergleich zum ersten Therapieversuch.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängerte sich das Überleben höchst signifikant um 12–13 Tage. Anhand des Kaplan-Meier-Überlebensdiagramms wurde ein signifikant späteres Ausscheiden der Tiere der iRGD-Therapiegruppe im Verlauf des Therapieversuches festgestellt (siehe IV. 4.2.6). Da die Euthanasie der Mäuse aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien ausschließlich in Hinblick auf die Tumoren erfolgte, würde dies auf eine verbesserte Wirkung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC durch die Koadministration des iRGD schließen lassen. Allerdings konnte in Bezug auf die absolute Volumenänderung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen festgestellt werden. Vermutlich hatte die nur tendenziell ausgeprägte langsamere Volumenänderung in der iRGD-Therapiegruppe dennoch dazu geführt, dass eine größere Anzahl der Tiere in der iRGD-Therapiegruppe zu einem späteren Zeitpunkt euthanasiert werden musste als in der NaCl-Therapiegruppe (siehe IV. 4.2.6, Tabelle 22). Die ähnliche mittlere Überlebenszeit in beiden Therapiegruppen, mit nur etwa einem Tag längerem Überleben in der iRGD-Therapiegruppe, relativiert dieses Ergebnis allerdings.

Resümierend konnte am Ende des zweiten Therapieversuches festgehalten werden, dass die gleiche Dynamik bezüglich der Ausscheidung und Verfügbarkeit von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wie im ersten Therapieversuch vorlag und die längere Wachstumsstagnation sowie das längere Überleben der Tiere in erster Linie dem zweiten Therapiezyklus angerechnet werden konnte und nicht der höheren applizierten Aktivität. Es bewies zwar die Effektivität der PRRT mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in diesem Fall, jedoch zeigte die zusätzliche Applikation von iRGD bisher keinen signifikant effektiveren Therapieerfolg hinsichtlich einer deutlich langsameren Tumolvolumenänderung. Dies führte zu der Veranlassung das iRGD-Applikationsregime für den dritten Therapieversuch zu modifizieren (siehe III. 9.5.3.1).

Die Modifikation des iRGD-Regime im dritten Therapieversuch sollte Aufschluss darüber geben, ob eine zu geringe Verfügbarkeit des iRGD am Tumor schuld an den bisher mangelnden Effekten des iRGD war. Für die Vergleiche zwischen dem dritten Therapieversuch und den anderen beiden Therapieversuchen gilt für die Zeitangaben zu beachten, dass hier die Therapie einen Tag früher als bei den beiden vorangegangenen Therapieversuchen begonnen wurde und damit für die absolute Zeit für diesen Versuch ein Tag dazu gezählt werden muss. Der frühere

Therapiebeginn sollte ein noch kleineres Anfangstumorvolumen bedingen.

Da eine intravenöse Applikation des iRGD anstelle der intraperitonealen Injektion aus bereits genannten Gründen den Versuchen nicht zuträglich gewesen wäre, erfolgten im dritten Therapieversuch neben den intraperitonealen Applikationen des iRGD Subkutan-Applikationen direkt in die Umgebung des Tumors, die eine durch alleinige intraperitoneale Injektion eventuell eine zu geringe Anreicherung des iRGD im subkutanen Tumor und damit einen mangelhaften Wirkspiegel ausschließen sollten. Zudem erfolgte die Therapie einen Tag früher, um zu evaluieren, ob noch kleinere, aber dennoch messbare Tumorvolumina zu Therapiebeginn eine bessere Voraussetzung für therapeutische Erfolge böten. Eine sichtbare tumorinduzierte Angiogenese fand erfahrungsgemäß auch bei sehr kleinen, soliden, subkutanen Tumoren statt. Trotz der erwiesenen nephrotoxischen Auswirkung durch die erhöhte Aktivität zeigten die Mäuse in ihrem Verhalten, Allgemeinbefinden und Körpergewicht keine negativen Veränderungen. Daher konnte die Aktivitätshöhe auch im dritten Therapieversuch beibehalten werden, um das geänderte iRGD-Regime beurteilen zu können.

Es zeigte sich, dass die therapeutische Wirkung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zwischen Tag 3 und Tag 6 einsetzte, wobei nur in der iRGD-Therapiegruppe an Tag 3 bereits ein signifikanter Unterschied zu Kontrollgruppe verzeichnet werden konnte. Ab Tag 6 war dieser jedoch für beiden Therapiegruppen hoch signifikant (siehe IV. 4.3.2). Anders als bei den vorherigen Therapieversuchen konnte in diesem eine kontinuierliche Volumenabnahme bzw. Stagnation des Tumorwachstums bis Tag 20 verzeichnet werden (siehe IV. 4.3.2, Tabelle 23). Dies deutet auf ein allgemein besseres Ansprechen einer Therapie bei geringeren Tumorvolumina zu Therapiebeginn hin. Allerdings ist zu bemerken, dass die Tumoren in der Kontrollgruppe zwar kontinuierlich wuchsen, diesmal tendenziell jedoch weniger schnell. Jedoch mussten die ersten Kontrolltiere ebenfalls bereits an Tag 16 und der Großteil an Tag 20 aufgrund der gesetzten Abbruchkriterien im Hinblick auf die Tumoren euthanasiert werden. Die ersten Therapietiere aus beiden Gruppen mussten hingegen erst an Tag 37 euthanasiert werden (siehe IV. 4.3.7 Tabelle 29). Insgesamt wiesen die Mäuse in den Therapiegruppen mit einer mittleren Überlebenszeit von  $40 \pm 0,7$  Tagen in der NaCl-Therapiegruppe und  $41,4 \pm 1,1$  Tagen in der iRGD-Therapiegruppe ein ca. 11 Tage längeres Überleben nach erfolgter Therapie auf als im zweiten Therapieversuch. Im

Vergleich zur Kontrollgruppe des dritten Therapieversuches verdoppelte sich die mittlere Überlebenszeit sogar. Die deutlich längere Überlebensspanne bei den Therapietieren stellt, ungeachtet eines in diesem Therapieversuch eventuell langsameren Tumorwachstums, ein weiteres Argument für das bessere Ansprechen der Therapie bei kleineren Tumoren dar. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass in der nicht therapierten Kontrollgruppe des dritten Therapieversuches ähnliche Verläufe auftraten wie in den Kontrollgruppen der beiden vorherigen Therapieversuche. Sowohl die absolute Volumenänderung als auch die mittlere Überlebenszeit erbrachte keinen signifikanten Unterschied, der auf ein effizienteres Wirken des iRGD hinweisen würde.

Nach den drei erfolgten Therapieversuchen bei denen durch die Erhöhung des radioaktiven Therapeutikums keine verbesserte Wirkung erzielt werden konnte, kann eine zu geringe  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC-Verfügbarkeit für die Rezeptoren als Grund weitestgehend ausgeschlossen werden. Vielmehr lässt sich aufgrund des Verhaltens im zweiten Therapieversuch behaupten, dass auch die geringere Aktivitätshöhe von 25 MBq des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC aus dem ersten Therapieversuch bei wiederholter Verabreichung vermutlich denselben Effekt bei geringerer Nierentoxizität gehabt hätte. Als Grund für die nur marginal herbeigeführten tendenziellen Effekte durch das iRGD muss die Theorie aufgestellt werden, dass die Anwesenheit der  $\alpha\beta 3$ -Integrinrezeptoren ausschließlich bei den neu gebildeten Tumorgefäßen vorlagen und im Fall der AR42J-Tumoren somit keine ausreichende Effizienzsteigerung durch die Koadministration von iRGD herbeigeführt werden konnte. Die tumorinduzierte Angiogenese ist ein sehr komplexer und komplizierter Vorgang, der u. a. stark abhängig von der Sauerstoffversorgung des Tumors ist und einer ständigen Anpassung an die Gegebenheiten unterliegt (Weinberger, 2007a). Die Expression aktiver  $\alpha\beta 3$ -Integrine auf den Endothelzellen der Blutgefäße ist wiederum stark abhängig von der stattfindenden Angiogenese (Strömblad & Cheresch, 1996; Eliceiri & Cheresch, 1998). Sind etwa zum Zeitpunkt der Therapie jene Rezeptoren nicht oder in nicht ausreichendem Maße aktiv, kann das iRGD nicht effektiv wirken.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC stellt selbst schon eine sehr spezifisch wirkende Substanz dar, die bereits eine Internalisierung an der Tumorzelle selbst v. a. über die sstr2-Rezeptoren erfährt (Waser et al., 2009). Durch ein alleiniges Wirken des iRGD an den Tumorblutgefäßen konnte dieser Effekt augenscheinlich nicht

potenziert werden.

Bisherige Therapieversuche in Kombination mit iRGD fanden in erster Linie mit Zytostatika statt (Sugahara et al., 2010; Akashi et al., 2014). Die Anreicherungseigenschaften über den EPR-Effekt und anschließende Diffusion durch die Zellmembran machen Doxorubicin zu einem eher unspezifisch wirkenden Zytostatikum (Tacar et al., 2013). Etwas spezifischer stellt sich die Anreicherung von nab-Paclitaxel (Abraxane®) im neoplastischen Gewebe dar. Es bindet an Albuminrezeptoren (gp60) und durchdringt das Gefäßendothel mittels Transzytose (Hawkins et al., 2008). Der Albumin-Paclitaxel-Komplex bindet an sog. SPARC (Secreted Protein, Acid and Rich in Cysteine), Glykoproteine, die viele Tumoren überexprimieren, und gelangt vermutlich über den Wechsel zu Lipid-Bestandteilen der Zellmembran in die Tumorzelle (Desai et al., 2009). Als Nukleosidanalogon ist es Gemcitabin nur über entsprechende Nukleosidtransporter (human nucleoside transporter), die in der Zellmembran eingelagert sind, möglich in die Zelle zu gelangen (Mini et al., 2006). Hieraus ist ersichtlich, dass für den kombinatorischen Einsatz mit iRGD und entsprechende Therapieversuche hierfür völlig andere und verschiedenste Neoplasien zur Verfügung stehen als für den sehr spezifischen Einsatzbereich des <sup>177</sup>Lu-DOTATOC bei sstr2- und sstr5-positiven neuroendokrinen Neoplasien. In den Therapieversuchen von Sugahara und Mitarbeitern (2009, 2010), bei denen jene vielversprechenden Effekte durch die Koadministration von iRGD erzielt wurden, konnten Tumoren aus neoplastischen Zellen erzeugt werden, bei denen die Tumorzellen selbst die erforderlichen  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine exprimieren (Sugahara et al., 2009; Sugahara et al., 2010). Der Effekt durch die Koadministration von iRGD gestaltete sich im Gegensatz zu der vorliegenden Studie vermutlich deshalb in deren Therapiestudien als hocheffizient.

### Körpergewicht

Aus dem Gewichtsverlauf und des Vergleiches zwischen Ausgangsgewicht und Endgewicht abzüglich des Tumorgewichtes ist zu ersehen, dass die Mäuse aller Gruppen in allen drei Therapieversuchen vorwiegend eine Gewichtszunahme verzeichneten. Dies ließ darauf schließen, dass eine ausreichende Futteraufnahme stattgefunden haben musste, die Mäuse stets bei gutem Allgemeinbefinden waren und keine offensichtlichen Beeinträchtigungen durch die subkutanen Tumoren sowie das <sup>177</sup>Lu-DOTATOC entstanden waren.



### Leukozyten- und Thrombozytenzahlen zur Evaluierung der toxischen Wirkung von <sup>177</sup>Lu-DOTATOC auf das Knochenmark

Die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen wurden bestimmt, um eine Beeinträchtigung des Knochenmarks zu evaluieren, denn beide Zelltypen haben ihren Ursprung in den sich dort befindlichen pluripotenten Stammzellen (Sinowatz & Hees, 2006). In der Klinik sind diese beiden Zelltypen hierfür wichtige Parameter (Kwekkeboom et al., 2009). Zwar wiesen Mäuse im ersten Therapieversuch für Leukozyten und Thrombozyten Werte außerhalb des Referenzbereiches auf, jedoch waren diese Abweichungen größtenteils nah an den Grenzen der Referenzwerte (siehe IV. 4.1.5). Daher ließ sich für den ersten Therapieversuch keine aussagekräftige Behauptung für eine Beeinträchtigung des Knochenmarks aufstellen.

Im zweiten Therapieversuch zeigte sich ein deutlicheres Bild (siehe IV. 4.2.5). Die Thrombozytenzahlen lagen in beiden Therapiegruppen beim Großteil der Mäuse unterhalb des Referenzgrenzbereiches, was auf eine Schädigung des Knochenmarks hindeutet. Etwa die Hälfte der Mäuse, sowohl in der NaCl-Therapiegruppe als auch in der iRGD-Therapiegruppe, befand sich hinsichtlich der Leukozyten im Referenzbereich und die andere Hälfte darunter. Jene Abweichungen stellten sich bei den meisten Tieren allerdings als geringfügig dar. Werden die Abweichungen der Leukozytenzahlen in Kombination mit den deutlichen Abweichungen der Thrombozyten betrachtet, lässt das Gesamtbild auf eine Knochenmarksschädigung schließen.

Im dritten Therapieversuch befanden sich die Thrombozytenzahlen bei nahezu allen Mäusen in beiden Therapiegruppen deutlich unterhalb des Referenzbereiches. Dies deutet darauf hin, dass trotz einer insgesamt längeren Überlebenszeit und damit einem größeren Abstand zu der letzten Verabreichung des <sup>177</sup>Lu-DOTATOC, eine Knochenmarksschädigung bestand. Anders stellte sich das Bild bei den Leukozyten dar. Bei diesem Parameter wies der Großteil der Mäuse Zahlen innerhalb des Referenzbereiches auf. Dies passte auch zu dem unauffälligen Differentialblutbild. Das Verhalten der Leukozytenwerte könnte auf eine einsetzende Regeneration des Knochenmarks aufgrund des längeren Abstandes zur letztmaligen Aktivitätsapplikation hindeuten. Bei der Beurteilung der Leukozyten und Thrombozyten hinsichtlich ihrer Aussagekraft im murinen Organismus muss darauf hingewiesen werden, dass in der adulten Maus weiterhin

auch Hämatopoese in der Milz stattfindet (Haley, 2003).

Beide Therapiegruppen zeigten in allen drei Therapieversuchen für beide Parameter stets ein sehr ähnliches Bild, was vermuten lässt, dass keine abweichenden Beeinträchtigungen oder günstigere Umstände durch die Koadministration von iRGD aufgetreten waren.

#### Toxische Wirkung von $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC auf die Nierenfunktion

Besonders Augenmerk wurde in dieser Studie auf die Nierengesundheit gelegt, da diese einen essentiell limitierenden Faktor für die PRRT darstellt (Forrer et al., 2007). Die dynamische  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie wird in der klinischen Diagnostik als gängiges Verfahren zur Überprüfung der Nierenfunktion beim Einsatz von nephrotoxischen Therapeutika eingesetzt, weshalb diese auch in der vorliegenden Studie Anwendung fand (Kobe, 2013; Zaknun et al., 2013). Die Berechnung der FUR gibt in der Praxis Aufschluss über das Aufnahmevermögen der Nieren. Allerdings berücksichtigt das Modell der FUR lediglich die Aufnahme und nicht die Ausscheidung (Rutland et al., 2000). Dies entspricht nicht den tatsächlichen kinetischen Verhältnissen in den Ausscheidungsorganen, woraus eine Unterschätzung der Aufnahmerate resultiert. Deutlich wurde dies bei Nieren, die keine Exkretion mehr aufwiesen. In diesen Fällen erhöhte sich auch die FUR, was darauf hinweist, dass dieses Berechnungsmodell besser für kinetische Modelle geeignet ist, bei denen tatsächlich keine Ausscheidung erfolgt. Damit in erster Linie vergleichbare Zahlen sowohl für die renale Aufnahme als auch für die tubuläre Exkretion aus den gemessenen Daten generiert werden konnten, wurde eigens, in Anlehnung an das FUR-Modell, ein Berechnungsprogramm mit zwei Variablen implementiert. Dabei entspricht die  $\text{FUR}_{\text{kor}}$  der herkömmlichen FUR, nur mit entsprechend höheren Werten. Für die tubuläre Exkretion wurde die Variable  $k_{\text{Ex}}$  eingeführt. In Anbetracht der besseren Entsprechung des neu generierten Modells zum kinetischen Zustand in der Niere und einer höher signifikanten Korrelation der Veränderung beider neu geschaffenen Variablen zur verabreichten Höhe des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC als bei der herkömmlichen FUR, wurde das neue Auswertungsmodell in dieser Studie erstmalig angewendet (siehe IV. 4.1.4.1). Mittels der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie sind die Variablen  $\text{FUR}_{\text{kor}}$  und  $k_{\text{Ex}}$  in Kombination mit den Renogramm-Kurven gute

Werkzeuge zur Beurteilung der Aufnahmefunktion und der tubulären Exkretion der Nieren.

Ferner wurden im Blut der Tiere Kreatinin und Harnstoff bestimmt. Deren Konzentrationen werden in der Praxis regelmäßig als Parameter für die Beurteilung der Nierenfunktion bestimmt (Kwekkeboom et al., 2009; Newman et al., 2009). Sie werden beide ungehindert glomerulär filtriert und nur Harnstoff erfährt teilweise eine passive tubuläre Resorption (Nelson & Couto, 2010b; Fromm & Gäbel, 2005). Kreatinin wird in relativ konstantem Maße während des Muskelstoffwechsels aus Kreatinphosphat gebildet. Anders als Harnstoff, der in der Leber aus Ammoniak gebildet wird, ist Kreatinin auch größtenteils unabhängig vom Proteingehalt der Nahrung (Nelson & Couto, 2010b). So gesehen ergänzen die Kreatinin- und Harnstoffblutwerte die Ergebnisse der Nierenszintigraphie hinsichtlich der Funktionsfähigkeit der Glomerula.

Im ersten Therapieversuch befanden sich etwa bei einem Drittel der Mäuse, im zweiten und dritten Therapieversuch bei etwa der Hälfte der Mäuse die Harnstoffwerte außerhalb des Referenzbereiches, allerdings nicht, wie bei einer Nierenbeeinträchtigung zu erwarten, oberhalb, sondern unterhalb des Referenzbereiches. Die Verteilung der Mäuse war hierbei in jedem Therapieversuch in der NaCl-Therapiegruppe nahezu identisch mit der der iRGD-Therapiegruppe, sodass nie ein Unterschied bezüglich der Harnstoffwerte in beiden Therapiegruppen bestand. Da sowohl den Therapietieren als auch den gesunden Referenzmäusen dasselbe Futter angeboten wurde, kann jene Abweichung nicht mit einer unterschiedlichen Proteinzufuhr erklärt werden, sondern ließe eher eine verminderte Synthese in der Leber vermuten. Allerdings besitzt die Leber eine sehr große Entgiftungskapazität bezüglich des Harnstoffes, sodass eine verringerte Harnstoffserumkonzentration im Blut erst im Endstadium einer Lebererkrankung auftritt (Nelson & Couto, 2010c). Da sämtliche Mäuse jedoch kein reduziertes Allgemeinbefinden zeigten, ausreichend Nahrung aufnahmen und auch bei der makroskopischen Obduktion nach der Euthanasie keine gravierenden Leberveränderungen sichtbar waren, ist die Aussagekraft diesbezüglich fraglich. Die Harnstoffwerte sind in diesem Fall als nicht geeignet für eine Aussage zur Nierengesundheit zu beurteilen und werden im Folgenden nicht weiter diskutiert.

Bei der einmaligen Verabreichung von 25 MBq des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in Kombination mit der nephroprotektiven Aminosäurelösung entwickelte sich augenscheinlich in keiner Therapiegruppe eine gravierende Nierenschädigung. In beiden Therapiegruppen wurde dagegen bei der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie, die um den Tag 20 nach der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC-Applikation stattfand, eine tendenzielle Verbesserung der Werte im Vergleich zur Baseline-Messung festgestellt, wobei sich die  $\text{FUR}_{\text{kor}}$  in der iRGD-Therapiegruppe sogar als signifikant verbessert bezeichnen ließ (siehe IV. 4.1.4.2). Ähnliches konnte in der Studie von Ilhan (2013) zu Strategien zur Nephroprotektion bei der Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE ermittelt werden, bei der u. a. zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation von 10, 20, 40 und 65 MBq besagten Radiopharmakons  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien gemacht wurden. Hier zeigte sich bei der Applikation von 20 MBq ohne zusätzliche Nierenprotektion zwar 9 Tage p. i. zunächst eine Verschlechterung in Hinblick auf die FUR. Ab Tag 23 wurde ein Anstieg der FUR verzeichnet, der jedoch nicht den Wert der Baseline-Messung übertraf (Ilhan, 2013). In der Studie von Ilhan (2013) wurde allerdings die FUR auf herkömmliche Weise generiert, ohne dass eine Exkretion berücksichtigt wurde. Der in beiden Therapiegruppen gestiegene Peak %ID passte zu der gestiegenen  $\text{FUR}_{\text{kor}}$ . Mit einem höheren Peak %ID lässt sich auch die in der NaCl-Therapiegruppe verlängerte TTP erklären (siehe IV. 4.1.4.3). Der einzige signifikante Unterschied bezüglich der Ergebnisse bei den  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien zwischen der iRGD-Therapiegruppe und der NaCl-Therapiegruppe wurde für die Veränderung in der Länge des TTP festgestellt. Daher lässt sich behaupten, dass die Therapie mit einmalig 25 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC ähnliche Auswirkungen in beiden Therapiegruppen auf die Nieren hatte. Bei dem Großteil der Mäuse lag der Kreatininwert über dem Referenzbereich, was auf eine Schädigung der Nieren, v. a. der Glomerula hinweist. Glomerula gelten im Vergleich zu den Tubuli als strahlenempfindlicher (Gotthardt, 2010). Das Kreatinin befand sich bei nahezu allen Mäusen der beiden Therapiegruppen oberhalb des Referenzbereiches, weshalb auch hier kein Unterschied zwischen den Therapiegruppen festzustellen war.

Die höhere Dosierung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im zweiten Therapieversuch geschah in erster Linie aus therapeutischen Gründen. Bei der Biodistribution zeigte sich

v. a. nach 24 h tendenziell weniger Anreicherung in den Nieren der Mäuse der iRGD-Gruppe. Die Ergebnisse der Dosimetrie stellten sich für die Nieren ebenfalls in der iRGD-Gruppe tendenziell günstiger dar. Im ersten Therapieversuch waren auch einzelne Befunde der  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien in der iRGD-Therapiegruppe besser als in der NaCl-Therapiegruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen konnte nicht festgestellt werden. Als Nebeneffekt einer höheren Therapieaktivität, mit vermutlich auch größeren Auswirkungen auf die Nierenfunktion, wurden sich aussagekräftigere Unterschiede zwischen der iRGD- und der NaCl-Therapiegruppe erhofft.

Im zweiten Therapieversuch stellte sich eine Verschlechterung sowohl in Bezug auf die  $\text{FUR}_{\text{kor}}$  als auch auf die Exkretionsrate ein (siehe IV. 4.2.4.1). Somit hatten die Nieren einen Funktionsverlust zu verzeichnen, sowohl in ihrer Aufnahmekapazität als auch in ihrer tubulären Exkretionsfähigkeit. In bereits genannter Studie von Ilhan (2013) wurden in Hinblick auf die FUR um den Tag 23 nach einer Verabreichung von 40 bzw. 65 MBq des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE ohne Nephroprotektion ebenfalls schlechtere Werte verzeichnet (Ilhan, 2013). Das Zeitfenster, nach dem die  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphien stattfanden, ist ähnlich dem in dieser Studie, da hier 20 Tage nach erfolgtem letzten Therapiezyklus mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC gemessen wurde. Die Renogramm-Kurven von Baseline- und posttherapeutischer Nierenszintigraphie verliefen in der iRGD-Therapiegruppe nahezu identisch, in der NaCl-Therapiegruppe zeigte die Renogramm-Kurve der posttherapeutischen Messung einen flacheren Verlauf, was auf eine langsamere Ausscheidung in dieser Therapiegruppe schließen lässt (siehe IV. 4.2.4.2). Auch die TTP dauerte in der NaCl-Therapiegruppe in der posttherapeutischen Messung signifikant länger als bei ihrer Baseline-Messung. Somit hatte sich die Nierenfunktion in der NaCl-Therapiegruppe augenscheinlich in größerem Maße verschlechtert. Dennoch kann nicht behauptet werden, dass beide Therapiegruppen signifikant unterschiedliche Verläufe aufwiesen. Gleiches gilt auch für die Verteilung der Mausezahlen hinsichtlich der Veränderungen der Blutparameter. Wie schon im ersten Therapieversuch befand sich der Großteil der Mäuse oberhalb des Referenzbereiches für Kreatinin, weshalb behauptet werden kann, dass auch im zweiten Therapieversuch die Mäuse beider Therapiegruppen gleichermaßen eine Schädigung ihrer Glomerula erfahren hatten.

Ein etwas anderes Bild zeigte sich im letzten Therapieversuch, wobei das identische Verhalten bezüglich der ermittelten Ergebnisse in beiden Therapiegruppen auch in diesem Therapieversuch wiederkehrte. Während sich die exkretorischen Werte signifikant verschlechterten, erwiesen sich die Werte für die  $FUR_{kor}$  bei der posttherapeutischen Messung als mehr oder weniger unverändert gegenüber den Baseline-Messungen (siehe IV. 4.3.4.1). Der Peak %ID stellte sich in der posttherapeutischen Messung bei den Nieren beider Therapiegruppen signifikant höher dar, bei allerdings verlängerter TTP (siehe IV. 4.3.4.2). Diese verlängerte TTP lässt sich mit der verschlechterten Exkretion bei gleichbleibender  $FUR_{kor}$  erklären. Aufgrund dieser Konstellation verschiebt sich der Peak %ID auf einen späteren Zeitpunkt. Der höhere Peak %ID würde auf eine bessere Nierenfunktion hindeuten, die verlängerte TTP relativiert dies allerdings. Es könnte sein, dass die Nieren nach der radiogenen Schädigung ihre Funktionsfähigkeit über eine Hypertrophie kompensierten (Myers & McGavin, 2009). Makroskopisch erschienen die Nieren der Mäuse bei der Obduktion nicht vergrößert. Allerdings existierte kein Größenvergleich der jeweiligen Nieren zum Zeitpunkt der Baseline-Messung. Die Größe bzw. des Volumen der Niere scheint jedenfalls Einfluss auf die Aufnahmekapazität des Organs zu haben. Linke und rechte Mäusenieren variieren in ihrer Größe. So wird das Volumen einer linken Mäusenieren mit  $0,15 \text{ cm}^3$  angegeben und das einer rechten Mäuseniere mit  $0,18 \text{ cm}^3$  (Kolbert et al., 2003). Die linken und rechten Nieren konnten auch in der vorliegenden Studie bei der Auswertung der  $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ -Nierenfunktionsszintigraphien getrennt voneinander betrachtet werden. Dabei war zu beobachten, dass die kleineren linken Nieren sowohl bei der  $FUR_{kor}$  als auch im Peak %ID (mit Ausnahme der Nieren, die keine Exkretion mehr zeigten) bei allen drei Therapieversuchen in den Baseline- und posttherapeutischen Messungen stets niedrigere Werte als die rechten Nieren zeigten. Interessant war auch, dass in dem letzten Therapieversuch die Kreatininwerte aller Mäuse im Referenzbereich lagen, was auf eine eingetretene Regeneration hindeuten könnte. Vermutlich stand diese Erholung des Wertes in Zusammenhang zum längeren Überleben der Mäuse und damit zum längeren Abstand der Blutentnahme zur letztmaligen Applikation des  $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ .

Der Hinweis zu den Blutausstrichen einiger Mäuse auf eine Polychromasie der Erythrozyten, die laut Labor auf eine ausgeprägte Regeneration der Erythrozyten

hindeuten, spricht dafür, dass die Nieren neben ihrer Funktion als Ausscheidungsorgane immer noch der Produktion von Erythropoetin befähigt waren (Fromm & Gäbel, 2005). Nieren mit starker chronischer Schädigung verlieren die Fähigkeit, Erythropoetin zu bilden und eine Anämie zählt dabei zum typischen Krankheitsbild (Nelson & Couto, 2010d).

Die histologische Untersuchung der Nieren ermöglichte eine differenzierte Betrachtung der funktionellen Zellen im Nephron. Die am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München generierten Ergebnisse aus der vorliegenden Studie werden hier integrierend diskutiert. Die Untersuchung ergab, im Vergleich zum histologischen Aussehen gesunder Nieren, massive Veränderungen, v. a. im Bereich der proximalen Tubuli, wie epitheliale Degenration, Dilatation und intraluminale Akkumulation proteinreichen Materials (siehe IV. 4.3.8), die bei toxisch bedingten Nierenschädigungen zu erwarten waren (Rolleman et al., 2007c; Newman et al., 2009; Ilhan, 2013). Auch die Glomerula wiesen deutliche pathologische Veränderungen wie etwa mesangiale Ödeme mit teilweiser Verlegung des Raums der Bowman-Kapsel auf. Zudem zeigten Podozyten und Parietalzellen eine mittelgradige Hypertrophie und bzw. oder eine Hyperplasie. Dies würde die Theorie der kompensatorischen Hypertrophie unterstützen. In anderen Studien kennzeichneten sich Veränderungen in den Glomerula in erster Linie durch eine glomeruläre Schrumpfung (Rolleman et al., 2007c; Ilhan, 2013). Eine radiogene Schädigung der proximalen Tubuli war bei der verabreichten Höhe des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zu erwarten, da diese Strukturen innerhalb der Nieren einer Strahlung am stärksten ausgesetzt sind (Rolleman et. al., 2010). Erfahren die Glomerula zu den radioaktiven Somatostatinanaloga im Grunde nur während der glomerulären Filtration einen direkten Kontakt, so findet in den proximalen Tubuli die Rückresorption sowie eine Speicherung in den proximalen Tubulusepithelzellen eines gewissen Teils des Radiopharmakons statt (Duncan et al., 1997; Rolleman et al., 2010). Die in der vorliegenden Studie dennoch umfangreiche Schädigung im Bereich der Glomerula könnte mit der mittleren Reichweite der Strahlung von  $^{177}\text{Lu}$  von 0,7 mm in den im Verhältnis kleinen Mäusenieren zu erklären sein. Scheinbar waren die Nieren der Mäuse in der iRGD-Therapiegruppe häufiger von Schädigungen betroffen als jene in der NaCl-Therapiegruppe. Jedoch waren von 4 therapierten Mäusen mit histologisch nicht auswertbaren Nieren 3 aus der NaCl-

Therapiegruppe. Wie sich das Verhältnis verschoben hätte, wären jeweils die Nieren der gleichen Anzahl von Mäusen auswertbar gewesen, kann nicht gesagt werden. Es sei jedoch angemerkt, dass die Nieren jener nicht auswertbaren Mäuse hinsichtlich ihrer Exkretionsrate in den  $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ -Nierenfunktionsszintigraphien eine deutliche Verschlechterung aufwiesen.

Sowohl die Werte aus der Nierenszintigraphie ( $\text{FUR}_{\text{kor}}$ , Peak %ID), als auch die Tatsache, dass sich die Kreatininwerte aller Mäuse wieder im Referenzbereich befanden, zusammen mit der Vermutung, dass die Nieren weiterhin die Fähigkeit besaßen, noch Erythropoetin bilden zu können, sprechen dafür, dass eine Regeneration der Nieren in diesem dritten Therapieversuch eingesetzt hatte. Gegen diese Annahme stellen sich allerdings v. a. die verschlechterten Werte in der Exkretionsrate und die histologischen Befunde. In welche Richtung sich die besprochenen Ergebnisse zur Evaluierung der Nierenfunktion langfristig entwickelt hätten, kann nicht beurteilt werden, da die Mäuse aufgrund der Abbruchkriterien nach maximal 50 Tagen euthanasiert werden mussten. Eine erneut einsetzende deutliche Verschlechterung der Nierenfunktion bei Mäusen, die 40 bzw. 65 MBq  $^{177}\text{Lu-DOTATATE}$  erhalten hatten, konnte erst am Tag 65 festgestellt werden (Ilhan, 2013). Rolleman und Mitarbeiter (2007c) hatten bei einmaliger Verabreichung von 555 MBq  $^{177}\text{Lu-DOTATATE}$  eine Schädigung an Rattennieren nach 100 Tagen festgestellt. Das Kreatinin zeigte sich damals erst nach dieser Zeit erhöht und es entwickelte sich ein mit der Zeit zunehmender histologisch sichtbarer Schaden (Rolleman et al., 2007c). Umgerechnet auf das Gewicht der Mäuse entspräche das verabreichte  $^{177}\text{Lu-DOTATATE}$  etwa 55 MBq, in dessen Höhe sich das  $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$  auch in der vorliegenden Studie bewegte. Die Feststellungen von Ilhan (2013) und auch von Rolleman und Mitarbeitern (2007c) lassen vermuten, dass auch die Mäuse in der vorliegenden Studie einen irreversiblen Nierenschaden zu verzeichnen hatten. Allerdings wurde in beiden genannten Studien das  $^{177}\text{Lu-DOTATATE}$  verwendet, das in den Nieren eine längere Verweildauer aufweist als  $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$  (Esser et al., 2006). Zudem erhielten die Tiere in der vorliegenden Studie eine nephroprotektive Arginin-Lysin-Aminosäurelösung. Diese Aminosäurelösungen reduzieren nachweislich die Aufnahme radioaktiver Somatostatinanaloge (Rolleman et al., 2003). Nachteilig für die Nieren stellte sich allerdings der gezwungenermaßen kurze Zeitraum von 8 Tagen zwischen den einzelnen Therapiezyklen dar. Nach



Betrachtung der generierten Ergebnisse im Zusammenhang konnte auch im dritten Therapieversuch weder ein nachteiliger noch ein vorteiliger Effekt auf die Nierenfunktion durch die Koinjektion des iRGD eindeutig ermittelt werden.

### Grenzen der Studie und klinische Übertragbarkeit

Die Auswahl der Zelllinien war durch die umfangreichen Eigenschaften, die diese erfüllen mussten, nur sehr begrenzt. Das wichtigste Kriterium stellte die komplexe Rezeptorexpression dar. Neben den Somatostatinrezeptorsubtypen sstr2 und sstr5 musste die Anwesenheit der für die Wirkung des iRGD essentiellen  $\alpha\beta3$ -Integrine sichergestellt werden. Daneben mussten die Zellen für diese umfangreiche Studie ein zuverlässiges Tumorstadium zeigen. Wie aus den vorangegangenen Ausführungen ersichtlich versprach nur die AR42J-Zelllinie des Rattenpankreaskarzinoms, jene Kriterien zu erfüllen, weshalb nur diese in den Therapiestudien ihren Einsatz finden konnte. Zelllinien, die in den Studien von Sugahara und Mitarbeitern (2009, 2010) verwendet wurden, sind keine Vertreter neuroendokriner Neoplasien und besitzen daher auch nicht die Somatostatinrezeptoren. Dafür exprimierten jene Tumorzellen eine große Anzahl an  $\alpha\beta3$ -Integrinen und Neuropilin-1-Rezeptoren (Sugahara et al., 2009; Sugahara et al., 2010). Die für die vorliegende Studie zur Verfügung gestandene MIA PaCa-2-Zelllinie, die von Akashi und Mitarbeitern (2014) erfolgreich eingesetzt worden war, erfüllte ebenfalls nicht das Kriterium des Somatostatinrezeptorvorkommens. Abstriche mussten bei dem Einsatz der AR42J-Zelllinie auch dahingehend gemacht werden, dass die Tumoren mit ihrem aggressiven und schnellen Wachstum sowie des starken Blutraichums nicht den Eigenschaften eines typischen, langsam wachsenden und tendenziell weniger durchbluteten NET entsprachen (siehe II. 1.2).

Das subkutane Tumormodell stellt ein Modell dar, das eine erste Einschätzung für die Fragestellung, ob eine Effizienzsteigerung der therapeutischen Wirkung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC durch die Koadministration des iRGD-Peptids erreicht werden kann, ermöglicht. Eine direkte Übertragung auf die Klinik kann aufgrund der Lokalisation des Tumors an eine Stelle, die nicht den realen Bedingungen im Organismus entspricht, schwerlich stattfinden (Stelter et al., 2007). Hierfür wären orthotope Tumormodelle sicherlich besser geeignet, bringen jedoch, wie bereits

erörtert, wieder andere Problematiken mit sich. Da das Tumorwachstum nach den ersten Therapiezyklen früher als erwartet eingesetzt hatte, konnte auch kein der Klinik entsprechender Zeitraum zwischen den Therapiezyklen eingehalten werden. Zudem stellte das Tumolvolumen ein Abbruchkriterium dar, das keine Langzeitbeobachtung der Entwicklung der Nierenfunktion nach erfolgter Therapie zuließ.

Der Einsatz immunsupprimierter Mäuse ohne T- und B-Lymphozyten stellt einen gravierenden Unterschied zum Immunsystem des Menschen und zu dem anderer Tiere dar. Zudem findet, im Gegensatz zum Menschen, bei der erwachsenen Maus weiterhin eine Hämatopoese in der Milz statt (Haley, 2003; Mestas & Hughes, 2004). Die in dieser Studie generierten Blutparameter von Leukozyten und Thrombozyten zur Beurteilung der Knochenmarksschädigung müssen deshalb eventuell relativiert betrachtet werden. Der prozentuale Anteil von im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten, die den Hauptteil der Leukozyten darstellen, variiert ebenfalls extrem zwischen Mensch (50–70 %) und Maus (10–25 %) (Mestas & Hughes, 2004). Selbst zwischen den verschiedenen, in der präklinischen Forschung verwendeten Mauslinien variieren die Blutreferenzwerte. So sind zwar die Blutwerte innerhalb einer Mauslinie vergleichbar, jedoch nicht auf den Menschen übertragbar.

Die geringe Größe der Mäuse brachte Einschränkungen bezüglich der zu applizierenden Volumina. Ferner weisen Mäuse nur begrenzt venöse Zugänge auf. Die Schwanzvene, als notwendige Applikationsstelle, erwies sich zudem bei den SHO-Mäusen als sehr labil und die Schwänze bedurften der größtmöglichen Schonung, damit das Erfolgen aller Messungen und Therapien sichergestellt werden konnte. Aus diesem Grund wurde auch von den zusätzlichen  $\mu$ PET-Messungen mit  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC abgesehen, die in der Klinik mit PET/CT-Untersuchungen ihre Entsprechung finden (Poeppel et al., 2011). Des Weiteren musste auch eine Auswahl bezüglich der zu bestimmenden Blutparametern getroffen werden, da bei der finalen Blutentnahme nur ein begrenztes Blutvolumen zur Verfügung stand. So musste beispielsweise von der Bestimmung diverser Leberparameter abgesehen werden, die in der Klinik im Rahmen einer PRRT regelmäßig untersucht werden (Kwekkeboom et al., 2009). Zur Vervollständigung der Untersuchung der Nierenfunktion wäre eine Urinuntersuchung wünschenswert gewesen. Für die Generierung einer

aussagekräftigen Urinuntersuchung mit Bestimmung des Harnstoff-Kreatinin-Quotienten oder des Protein-Kreatinin-Verhältnisses wären laut Aussage des Labors 500 µl Urin notwendig gewesen. Dieses Volumen war aus einer physiologisch hydrierten Maus nicht zu gewinnen. Anhand dieser einschränkenden Faktoren wird ersichtlich, dass eine gänzlich der Klinik entsprechende Gestaltung der Therapieversuche schwerlich möglich war.

Einen gravierend limitierenden Faktor für den Vergleich zwischen Mensch und Maus stellt der Größenunterschied der beiden Spezies dar. Für die interne Bestrahlung spielen die Verteilung und die Reichweite des Radionuklids, die Dosisleistung (die für jedes Radionuklid spezifisch ist), die Strahlenempfindlichkeit der Strukturen sowie die Größe des Organs eine Rolle. Wird die biologisch effektive Dosis verwendet, die all diese Faktoren berücksichtigt, generieren sich höhere tolerierte Gesamtdosiswerte (Barone et al., 2005; Gotthardt, 2010). Zudem finden während der Wirkung der internen Bestrahlung bereits Reparaturvorgänge statt, die einen Teil der Schädigung schon während der Bestrahlung wieder aufheben (Kotzerke & Oehme, 2010). In wie weit dies auf die Nieren im Mausmodell übertragbar ist, ist fraglich. Bei der Größe einer Mäuseniere mit einem Volumen von 0,15 bis 0,18 cm<sup>3</sup> lässt die maximale Reichweite von 2,5 mm und die durchschnittliche Reichweite von 0,7 mm des <sup>177</sup>Lu, unabhängig von der Verteilung innerhalb der Niere, eine schädliche Auswirkung auf wesentlich größere Bereiche der Niere, verglichen mit einer humanen Niere, vermuten (Kolbert et al., 2003; Schicha & Schober, 2013a). Bereits der Größenunterschied zwischen einer Mäuseniere und einer Rattenniere (mit einem Volumen von 1,6 cm<sup>3</sup>) scheint einen Unterschied im radiogenen Schädigungsausmaß zu bedingen (Konijnenberg et al., 2004). Vor diesem Hintergrund stellt sich daher die Frage, ob das hier aufgetretene Bild der radiogenen Schädigung der murinen Nieren in der menschlichen Niere ein ähnliches Bild gezeigt hätte.

### Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in einem Mausmodell mit aggressiv wachsenden Flankentumoren eine therapeutische Wirkung erzielt werden kann. Werden die Therapieversuche verglichen, so kann behauptet werden, dass der Therapiebeginn beim Vorliegen kleinerer Tumervolumina einen größeren Erfolg verzeichnete. Eine geringere Aktivität von 25 MBq kann denselben den Zeitraum einer Wachstumsstagnation bewirken wie etwa 50 MBq es können, da weniger die Höhe der Aktivität einen Zeitgewinn erbracht hatte, sondern die wiederholte Verabreichung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Eine ähnliche Feststellung konstatierten Erlandsson und Mitarbeiter (2011) bei Mäusen mit subkutanen NCI-H69-Tumoren. Die fraktionierte Verabreichung von dreimalig 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE zeigte mehr Wirkung als zweimalig 45 MBq. In dieser Studie wurden die 30 MBq Therapieaktivität allerdings an drei aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht (Erlandsson et al., 2011). Diese Beobachtung lässt sich vermutlich mit der Feststellung von Kölby und Mitarbeitern (2005) erklären, dass ab 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE eine Sättigung der Somatostatinrezeptoren eintritt (Kölby et al., 2005). In der vorliegenden Studie schienen 50 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC keinen größeren therapeutischen Effekt als 25 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zu haben. Das lässt vermuten, dass neben den sstr2 die sstr5 und das iRGD in diesem Fall auch keine vermehrte Anreicherung bewirkten. Die Gesamtdosis mit fraktionierten Applikationen von geringerer Aktivitätshöhe wäre der Nierengesundheit zuträglicher gewesen und hätte ebenfalls einen therapeutischen Effekt, wie es bereits bei AR42J-tumortragenden Ratten festgestellt worden war (Rolleman et al., 2007c). Diese Ergebnisse von Rolleman und Mitarbeitern (2007c) untermauern die in der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des therapeutischen Einsatzes von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im Mausmodell mit subkutanen AR42J-Tumoren. Es ist auch in präklinischen Studien mit tumortragenden Mäusen durchaus möglich, einen Abstand von wenigstens einer Woche zwischen den Therapiezyklen zu gewähren, um damit den Nieren eine Erholungsphase einzuräumen.

In den Therapieversuchen hatte sich bei einer als therapeutisch geltenden Höhe des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC kein signifikant effektiveres Ergebnis hinsichtlich der therapeutischen Wirkung bei der iRGD-Therapiegruppe gezeigt. Der Einsatz von

unterdosiertem  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC gäbe möglicherweise Aufschluss darüber, ob das iRGD doch eine Effizienzsteigerung herbeiführen könnte. Der mangelhafte Effekt des iRGD in dieser Studie hing vermutlich mit dem  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin-Rezeptoraufkommen zusammen, das bei den AR42J-Tumoren nur auf den Blutgefäßen zu vermuten war.

Für Studien mit radioaktiven Somatostatinanaloga in Kombination mit iRGD, die vergleichbar mit jenen von Sugahara und Mitarbeitern (2009, 2010) wären, müssten Tumorzelllinien gefunden werden, auf denen sowohl die Somatostatinrezeptoren als auch  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin-Rezeptoren exprimiert würden. Die MIA PaCa-2 könnte eine solche Zelllinie darstellen, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass sie sicher Somatostatinrezeptoren auf der Oberfläche exprimieren. Laut Literatur soll auch diese Ausprägung bei der MIA PaCa-2-Zelllinie existieren (Fisher et al., 1996; Gradiz et al., 2016). Akashi und Mitarbeiter (2014) haben bei dieser Zelllinie von einer signifikanten Mehranreicherung im Tumor bzw. signifikanten Verringerung der Tumorgroße bei der iRGD-koadministrierten Gemcitabintherapie berichtet (Akashi et al., 2014).

Eine Evaluierung der Auswirkungen von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC auf die Mäuseniere, in Kombination mit iRGD und ohne dessen Koadministration, empfiehlt sich zukünftig zunächst an tumorfreien Mäusen, da in diesem Fall keine zeitliche Limitierung aufgrund des Tumorwachstums bestünde und somit auch die Abstände zwischen den Therapiezyklen freier und kliniknäher gewählt werden können.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

iRGD (CRGDK/RGPDC), ein tumor-homing Peptid, das die Tumorpenetration ermöglicht, wurde in präklinischen Studien verschiedenen Zytostatika koadministriert und erhöhte deren Anreicherung in den Tumorzellen um ein Vielfaches und steigerte deren therapeutischen Effekt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob iRGD als Koinjektion zu [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotid ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) eine vergleichbare Effizienzsteigerung bezüglich dessen therapeutischer Wirkung erzielen kann.

In der vorliegenden Studie wurde ein Nacktmausmodell mit subkutanen somatostatinrezeptorpositiven Tumoren verwendet. Für die Erzeugung solider Tumoren wurden die etablierten sstr2- und sstr5-positiven AR42J- und NCI-H69-Zelllinien verwendet. Über  $\mu\text{PET}$ -Messungen mit dem  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD-Tracer wurde das Vorhandensein von  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinen bei beiden Tumorvarianten überprüft.

In Biodistributionsstudien, inklusive Dosimetrie, zeigten die NCI-H69-Tumoren der Mäuse sowohl in der iRGD-koadministrierten Gruppe als auch in der Gruppe, deren Tiere alternativ isotonische Natriumchlorid-Lösung erhielten, eine nur sehr geringfügige Anreicherung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Es bestand ein für die Therapie unerwünschtes Verhältnis, mit einer zu niedrigen Dosis in den Tumoren und einer zu hohen Dosis in den Nieren. Für die iRGD-Gruppe ergab sich kein deutlicher Vorteil. Aufgrund dieser Ergebnisse und in Anbetracht der unzuverlässigen Wachstumseigenschaften dieser Zelllinie waren die NCI-H69 nicht mehr weiter Gegenstand dieser Studie. Die AR42J-Tumoren zeigten in beiden Gruppen das erwünschte Anreicherungsverhältnis mit einer hohen Dosis in den Tumoren und einer niedrigeren Dosis in den Nieren. Zudem zeigte die iRGD-Gruppe tendenziell eine verbesserte Anreicherung in den Tumoren und eine verringerte Anreicherung in den Nieren. In Anbetracht der guten Wachstumseigenschaften der AR42J-Tumoren und dem guten Anreicherungsverhalten des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in vivo erfolgten die Therapieversuche.

Jeder der drei Therapieversuche bestand aus zwei Therapiegruppen und einer nicht therapierten Kontrollgruppe. Im ersten Therapieversuch erhielten die Mäuse der Therapiegruppen einmalig 25 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Im zweiten und dritten

Therapieversuch bekamen alle zu therapierenden Mäuse zweimal, im Abstand von 8 Tagen, jeweils 50 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Den Mäusen der einen Therapiegruppe wurde zu jeder Therapie zusätzlich das gelöste iRGD-Peptid und den Mäusen der anderen Therapiegruppe reine isotonische NaCl-Lösung nach bestimmten Verabreichungsregimen intraperitoneal injiziert. Im dritten Therapieversuch erfolgte zusätzlich zur intraperitonealen Verabreichung des iRGD noch dessen subkutane Applikation direkt in die Umgebung des Tumors. Ein wichtiges Kriterium bei der Dosierung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC war es, die Nephrotoxizität auf ein moderates Maß zu begrenzen. In jedem der drei Therapieversuche konnte eine eindeutige Verzögerung in der Zunahme des Tumolvolumens für die mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC therapierten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden. Eine Wachstumsstagnation von 7 Tagen im ersten Therapieversuch konnte im zweiten Therapieversuch auf rund 16 Tage verdoppelt und im dritten Therapieversuch auf 20–23 Tage verdreifacht werden. In keinem der drei Therapieversuche konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der therapeutischen Wirkung zwischen den beiden jeweiligen Therapiegruppen festgestellt werden. Die systematische Gestaltung der Therapieversuche erlaubt die Vermutung, dass der Grund für die ineffektive Wirkung des iRGD eine fehlende Expression der  $\alpha\beta 3$ -Integrine auf den AR42J-Tumorzellen zu sein scheint. Stattdessen fanden sich  $\alpha\beta 3$ -Integrine vermutlich lediglich auf den Endothelzellen der Tumorgefäße. Der iRGD-induzierte internalisierende Effekt konnte daher in keinem für die Therapie effizienzsteigernden Ausmaß stattfinden.

Die Mäuse beider Therapiegruppen durchliefen jeweils vor der Therapie und am Ende eines jeden Therapieversuches eine  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie. Für die Auswertung fand ein im Rahmen dieser Studie entwickeltes Auswertungsprogramm erstmalig Anwendung. Berechnet wurden die korrigierte „fractional uptake rate“  $\text{FUR}_{\text{kor}}$  und die Exkretionsrate  $k_{\text{Ex}}$ . Ergänzt wurde die Beurteilung der Nierenfunktion durch die Renogramm-Kurven, dem Peak %ID und der „time to peak“ sowie den Blutparametern Kreatinin und Harnstoff. Bei sämtlichen Nierenbeurteilungskriterien konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen der jeweiligen Therapieversuche ermittelt werden. Im ersten Therapieversuch fiel v. a. ein erhöhter Kreatininwert auf. Dies wies darauf hin, dass bereits eine niedrigere

Aktivität von 25 MBq des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC nierenschädigendes Potential, v. a. auf die Glomerula, zu haben schien. Die zweimalige Applikation von 50 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC im Abstand von 8 Tagen verursachte eine deutlichere Schädigung der Nieren, diesmal auch die Tubuluszellen betreffend. Die Nierenhistologie im dritten Therapieversuch zeugte von einer umfangreichen Schädigung, die v. a. die Glomerula und das proximale Tubulussystem betraf. Dennoch lag der Kreatininwert im Referenzbereich, die  $\text{FUR}_{\text{Kor}}$  zeigte sich unverändert und der Peak %ID hatte sich im Vergleich zur Baseline-Messung erhöht. Dies deutete trotz allem auf eine einsetzende Regeneration hin. Inwiefern sich die Nierenschädigungen langfristig gesehen als reversibel oder irreversibel darstellen, konnte nicht geklärt werden.

Die Effektivität der therapeutischen Wirkung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC auf somatostatinrezeptorpositive Tumoren konnte mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Kleinere Volumina der AR42J-Tumoren zu Therapiebeginn bewirkten eine längere Wachstumsstagnation dieser Tumoren. Bereits 25 MBq des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC haben therapeutisch gewirkt bei gleichzeitig weniger nierenschädigendem Potential. Ein verlängerter Wachstumsstillstand der Tumoren war in erster Linie auf die wiederholte Verabreichung des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zurückzuführen. Aufgrund dieser Beobachtungen heraus empfiehlt es sich, auch für präklinische Studien an Mäusen für die besten Therapieerfolge, den Therapiebeginn auf einen möglichst frühen Zeitpunkt bei kleinen Tumorumfängen zu legen. Zur Schonung der Nieren sollten mehrere Therapiezyklen mit einer niedrigeren Aktivitätshöhe in einem entsprechenden zeitlichen Abstand voneinander eingesetzt werden. Das eigens entwickelte Auswertungsprogramm für die  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenfunktionsszintigraphie stellt ein vielversprechendes Modell für die Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Nieren dar.

Eine iRGD-vermittelte Effizienzsteigerung des therapeutischen Einsatzes von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC bei somatostatinrezeptorpositivem, malignem Gewebe mit neuroendokrinen Eigenschaften konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Nachdem sich jedoch leichte Tendenzen in den diversen Versuchen zugunsten der Gruppen mit koadministriertem iRGD erkennen ließen, ist nicht auszuschließen, dass bei Tumorzelllinien, die eine Expression der  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrine auf den Tumorzellen selbst aufweisen, auch in Kombination mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC ein effizienzsteigernder Therapieeffekt bewirkt werden könnte.



## VII. SUMMARY

### **iRGD-mediated increase in efficiency of the therapeutic use of [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotide in somatostatin receptor-positive, malignant tissue with neuroendocrine features with a special consideration of the renal function in a mouse model**

Co-administration of the tumor-homing and penetrating peptide iRGD (CRGDK/RGPDC) increases the accumulation of cytostatic agents in tumor cells several-fold and enhances their therapeutic effects in preclinical. The objective of this doctoral thesis was to investigate whether iRGD as an adjunct to [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotide (<sup>177</sup>Lu-DOTATOC) can potentiate therapeutic response in a nude mouse model bearing subcutaneous somatostatin receptor-positive tumors. The solid tumors were derived from the established sstr2- and sstr5-positive AR42J and NCI-H69 cell lines. Through  $\mu$ PET scans using the <sup>68</sup>Ga-DOTA-iRGD as a tracer we monitored  $\alpha v \beta 3$ -integrins in both tumor variants.

In biodistribution and dosimetry studies the NCI-H69-tumors showed a very slight accumulation of <sup>177</sup>Lu-DOTATOC in both the iRGD co-administered and the saline group. The uptake ratio was unfavorable for therapy, with insufficient tumor uptake and excessive kidney uptake, and no significant advantage in the iRGD group. Based on this result, and in view of the unreliable growth characteristics of this cell line, the NCI-H69 was not further investigated. However, the AR42J-tumors showed the desired accumulation ratio with high <sup>177</sup>Lu-DOTATOC dose in the tumors and lower dose in the kidneys in both study groups. The iRGD adjunct group showed a trend towards enhanced tumor uptake and decreased kidney uptake. The subsequent therapy experiments were performed in consideration of the good growth characteristics of the AR42J tumors and their notable accumulation of <sup>177</sup>Lu-DOTATOC in vivo.

There were three therapeutic trials, each consisting of two treatment groups and one control group not undergoing therapy. In the first therapeutic trial, the treated mice received a single dose of 25 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTATOC. In the second and third therapeutic trials, all treated mice received two doses of 50 MBq at an interval of eight days. The mice of one treatment group received the iRGD peptide i. p. dissolved in saline, whereas the control group received only isotonic saline

injections. In the third trial, iRGD was applied by s. c. injection directly into the tumor mass, in addition to the i. p. administration of iRGD, as in the other trials. An important criterion for the selected  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC dosages was the need to limit nephrotoxicity. In each of the three treatment trials, we recorded a clear delay in the increase in tumor volume for all  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC groups compared to the control group. A growth stagnation of seven days in the first therapeutic trial was doubled to approximately 16 days in the second and tripled to 20–23 days in the third therapeutic trials. We noted no significant difference in the therapeutic effects between the two respective treatment groups for all three treatment trials. Given the systematic design of the therapeutic trials, the ineffectiveness of iRGD adjunct therapy for AR42J tumors seems attributable to the lack of expression of  $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrins in that cell line. Despite the presence of  $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrins on endothelial cells of the tumor vessels, there was evidently no basis for the iRGD-induced internalization which underlies the present adjunct treatment strategy.

The mice in both treatment groups received  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> renal scintigraphy at baseline and again at the end of each treatment trial. We undertook the development of a novel procedure for analysis of the preclinical scintigraphy, in which the corrected "fractional uptake rate"  $\text{FUR}_{\text{kor}}$  and excretion rate  $k_{\text{Ex}}$  were calculated. This quantitative assessment of renal function were supplemented by the renogram curves, the peak %ID and the "time to peak", as well as blood creatinine and urea levels. There were no significant differences in renal function between the two treatment groups. In the first therapeutic trial especially an increased creatinine was noticed, indicating that even the single 25 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC dose had some kidney-damaging potential, especially implicating the glomerula. The two-time dose of 50 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC at an interval of eight days caused more significant damage to the kidneys, now also involving the tubular cells. Histological examination in the third therapeutic trial gave evidence of extensive renal damage affecting the glomerula and proximal tubules. Nevertheless, creatinine remained within the normal range, the  $\text{FUR}_{\text{kor}}$  appeared unchanged and the peak %ID had increased relative to the baseline measurement. While this is suggestive of incipient recovery, the extent of recovery from acute kidney damage remains to be ascertained.

Results of the study confirmed the therapeutic effectiveness of the  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC treatment on somatostatin receptor-positive tumors. Smaller volumes of AR42J tumors at start of therapy predicted for longer growth stagnation upon treatment. Even 25 MBq of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC had some significant cytostatic effect, this obtained with less potential for renal damage. A more prolonged growth arrest of tumors was obtained with repeated administration of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Based on these observations, we can conclude that, also in preclinical studies in mice, better therapeutic results are possible with early treatment initiation, at a stage with smaller tumor volumes. In order to protect the kidneys, several cycles of therapy should be applied at a lower activity level and at appropriate intervals. The especially developed method for evaluation of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> renal scintigraphy shows promise for use in future studies.

We did not detect a significant iRGD-mediated increase in the efficacy of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC therapy in somatostatin receptor-positive tumors with neuroendocrine properties. However, there did emerge trends in the various experiments favoring the co-administration of iRGD, and the possibility cannot be excluded that tumor cell lines having expression  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -integrins (as distinct from endothelial expression) could be vulnerable to iRGD-enhancement of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC cytostatic action.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Acevedo LM, Barillas S, Weis SM, Göthert JR, Cheresh DA. Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood* 2008; 111: 2674-2680.

Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Kurokawa T, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K, Satake M, Ohkohchi N. Anticancer effects of gemcitabine are enhanced by co-administered iRGD peptide in murine pancreatic cancer models that overexpressed neuropilin-1. *Br J Cancer* 2014; 110: 1481-1487.

Alberici L, Roth L, Sugahara KN, Agemy L, Kotamraju VR, Teesalu T, Bordignon C, Traversari C, Rizzardi G-P, Ruoslahti E. De novo design of a tumor-penetrating peptide. *Cancer Res* 2013; 73: 804-812.

Allolio B, Schulte HM (Hrsg.) (2010) *Praktische Endokrinologie*. 2. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S.493-511.

Bailey DL, Townsend DW, Valk PE, Maisey MN (Eds.) (2005) *Positron Emission Tomography: Basic Sciences*. 1th edn, London: Springer. S. 29-35.

Barnett P. Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine* 2003; 20: 255-264.

Barone R, Borson-Chazot F, Valkema R, Walrand S, Chauvin F, Gogou L, Kvols LK, Krenning EP, Jamar F, Pauwels S. Patient-specific dosimetry in predicting renal toxicity with 90Y-DOTATOC: relevance of kidney volume and dose rate in finding a dose–effect relationship. *J Nucl Med* 2005; 46: 99S-106S.

Bartenstein P, Haug A, Hünerbein R. Nuklearmedizin. In: Reiser M, Kuhn F-P, Debus J (Hrsg.), *Duale Reihe. Radiologie*. 3. Auflage, Stuttgart: Thieme 2011: 138-147.

Becker PM, Waltenberger J, Yachechko R, Mirzapoiazova T, Sham JS, Lee CG, Elias JA, Verin AD. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor–mediated endothelial permeability. *Circ Res* 2005; 96: 1257-1265.

Beer AJ, Schwaiger M. Imaging of integrin  $\alpha\beta 3$  expression. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 631-644.

Beer AJ, Kessler H, Wester HJ, Schwaiger M. PET imaging of integrin  $\alpha\beta 3$  expression. *Theranostics* 2011; 1: 48-57.

Bison SM, Konijnenberg MW, Melis M, Pool SE, Bernsen MR, Teunissen JJ, Kwekkeboom DJ, de Jong M. Peptide receptor radionuclide therapy using radiolabeled somatostatin analogs: focus on future developments. *Clin Transl Imaging* 2014; 2: 55-66.

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.) (2012a) *Pathologie*. 5. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 343-356.

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.) (2012b) Pathologie. 5. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 506-513.

Bogden AE, Taylor JE, Moreau JP, Coy DH, LePage DJ. Response of human lung tumor xenografts to treatment with a somatostatin analogue (somatuline). *Cancer Res* 1990; 50: 4360-4365.

Böger C, Warneke VS, Behrens HM, Kalthoff H, Goodman SL, Becker T, Röcken C. Integrins  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  as prognostic, diagnostic, and therapeutic targets in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2015; 18: 784-795.

Boretti FS. (2008) Seltene Endokrinopathien beim Hund. In: 54. Jahreskongress, Deutsche Gesellschaft für Kleintiermedizin-Deutsche veterinärmedizinische Gesellschaft, Düsseldorf, Deutschland 25. September 2008 – 28. September 2008, <http://www.zora.uzh.ch/12047/1/SelteneEndokrinopathienV.pdf>, abgerufen am 13.01.2016.

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179: 77-79.

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin  $\alpha v \beta 3$  for angiogenesis. *Science* 1994a; 264: 569-571.

Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA. Integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994b; 79: 1157-1164.

Brooks PC, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. Antiintegrin  $\alpha v \beta 3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995; 96: 1815-1822.

Bubek B (1993) Technetium-99m-MAG3 für die nuklearmedizinische Nierenfunktionsdiagnostik: Pharmakokinetik und klinische Anwendung im Vergleich mit radiojodierter Hippursäure. 2. Auflage, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle: Huber. S.14-60.

Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M. Inhibition of the  $\alpha v$  integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br J Cancer* 2002; 86: 788-795.

Caplin ME, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, Oberg K, Pelosi G, Perren A, Rossi RE, Travis WD. Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European neuroendocrine tumor society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoid. *Ann Oncol* 2015; 26: 1604-1620.

Charles River Laboratories International (2008) The Crl: SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup>Mouse: A Double-Homozygous SCID Hairless Outbred Model, [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/sho/rm\\_rm\\_r\\_sho\\_pc3\\_xenograft\\_study.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/sho/rm_rm_r_sho_pc3_xenograft_study.aspx), abgerufen am 22.12.2015.

Clezardin P. Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 541-548.

Clifford CB, Pritchett-Corning KR. (2009) Trace Antibody Production by scid Mice, [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rm\\_rm\\_r\\_trace\\_antibody\\_production\\_scid\\_mice.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rm_rm_r_trace_antibody_production_scid_mice.aspx), abgerufen am 22.12.2015.

De Jong M, Barone R, Krenning E, Bernard B, Melis M, Visser T, Gekle M, Willnow TE, Walrand S, Jamar F, Pauwels S. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide. *J Nucl Med* 2005; 46: 1696-1700.

De Jong M, Valkema R, van Gameren A, van Boven H, Bex A, van de Weyer EP, Burggraaf JD, Körner M, Reubi JC, Krenning EP. Inhomogeneous localization of radioactivity in the human kidney after injection of [<sup>111</sup>In-DTPA] octreotide. *J Nucl Med* 2004; 45: 1168-1171.

Delker A, Ilhan H, Zach C, Brosch J, Gildehaus FJ, Lehner S, Bartenstein P, Böning G. The influence of early measurements onto the estimated kidney dose in [<sup>177</sup>Lu][DOTA0, Tyr3] octreotate peptide receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors. *Mol Imaging Biol* 2015; 17: 726-734.

Desai N, Trieu V, Damascelli B, Soon-Shiong P. SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients. *Transl Oncol* 2009; 2: 59-64.

Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 15-23.

Dvorak AM, Feng D. The vesiculo–vacuolar organelle (VVO): a new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 419-431.

Duncan JR, Stephenson MT, Wu HP, Anderson CJ. Indium-111-diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide is delivered in vivo to pancreatic, tumor cell, renal, and hepatocyte lysosomes. *Cancer Res* 1997; 57: 659-671.

Ehrhart N, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Wimsatt JH. Pancreatic beta cell tumor in ferrets: 20 cases (1986-1994). *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209: 1737-1740.

Eliceiri BP, Cheresh DA. Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 563-568.

Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4: 741-750.

Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1099-1107.

Erlandsson A, Forssell-Aronsson E, Seidal T, Bernhardt P. Binding of TS1, an anti-keratin 8 antibody, in small-cell lung cancer after <sup>177</sup>Lu-DOTA-Tyr3-octreotate treatment: a histological study in xenografted mice. *EJNMMI Res* 2011; 1: 19.

Esser JP, Krenning EP, Teunissen JJ, Kooij PP, van Gameren AL, Bakker WH, Kwekkeboom DJ. Comparison of [<sup>177</sup>Lu-DOTA0, Tyr3] octreotate and [<sup>177</sup>Lu-DOTA0, Tyr3] octreotide: which peptide is preferable for PRRT? *Eur J of Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33: 1346-1351.

Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM, Thompson JC. The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 733: 393-406.

Fani M, Andre JP, Maecke HR. <sup>68</sup>Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging* 2008; 3: 53-63.

Fasano M, Della Corte CM, Papaccio F, Ciardiello F, Morgillo F. Pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma: from epidemiology to therapy. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 1133-1141.

Felding-Habermann B, Mueller B, Romerdahl CA, Cheresch DA. Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest* 1992; 89: 2018-2022.

Fisher WE, Doran TA, Muscarella P, Boros LG, Ellison EC, Schirmer WJ. Expression of somatostatin receptor subtype 1-5 genes in human pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 322-324.

Fisher WE, Muscarella P, O'Dorisio TM, O'Dorisio MS, Kim JA, Doran TA, Sabourin CL, Schirmer WJ. Expression of the somatostatin receptor subtype-2 gene predicts response of human pancreatic cancer to octreotide. *Surgery* 1996; 120: 234-241.

Forrer F, Valkema R, Kwekkeboom DJ, de Jong M, Krenning EP. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21: 111-129.

Fossum TW (Hrsg.) (2009) *Chirurgie der Kleintiere*. 2. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 628-633.

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha$ v integrins. *Science* 1995; 270: 1500-1502.

Frilling A, Weber F, Saner F, Bockisch A, Hofmann M, Mueller-Brand J, Broelsch CE. Treatment with <sup>90</sup>Y- and <sup>177</sup>Lu-DOTATOC in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Surgery* 2006; 140: 968-977.

Fromm M, Gäbel G. Niere. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. 2. Auflage, Stuttgart: MVS Medizinverlage, Enke 2005: 277-302.

Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, Dobrozemsky G, Heute D, Uprimny C, Kovacs P, von Guggenberg E, Bale R, Virgolini IJ. 68Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. *J Nucl Med* 2007; 48: 508-518.

Gaertner FC, Kessler H, Wester HJ, Schwaiger M, Beer AJ. Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39: S126-S138.

Gal A, Ridgway MD, Fredrickson RL. An unusual clinical presentation of a dog with gastrinoma. *Can Vet J* 2011; 52: 641-644.

Ganguly KK, Pal S, Moulik S, Chatterjee A. Integrins and metastasis. *Cell ADH Migr* 2013; 7: 251-261.

Garbrecht N, Anlauf M, Schmitt A, Henopp T, Sipos B, Raffel A, Eisenberger CF, Knoefel WT, Pavel M, Fottner C, Musholt TJ, Rinke A, Arnold R, Berndt U, Plöckinger U, Wiedenmann B, Moch H, Heitz PU, Komminoth P, Perren A, Klöppel G. Somatostatin-producing neuroendocrine tumors of the duodenum and pancreas: incidence, types, biological behavior, association with inherited syndromes, and functional activity. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 229-241.

Gazdar AF, Carney DN, Russell EK, Sims HL, Baylin SB, Bunn PA, Guccion JG, Minna JD. Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of the lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res* 1980; 40: 3502-3507.

Gazdar AF, Helman LJ, Israel MA, Russell EK, Linnoila RI, Mulshine JL, Schuller HM, Park JG. Expression of neuroendocrine cell markers L-dopa decarboxylase, chromogranin A, and dense core granules in human tumors of endocrine and nonendocrine origin. *Cancer Res* 1988; 48: 4078-4082.

Giancotti FG, Mainiero F. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 47-64.

Gillespie J, Poston GJ, Schachter M, Guillou PJ. Human pancreatic cancer cell lines do not express receptors for somatostatin. *Br J Cancer* 1992; 66: 483-487.

Gotthardt M. Radiogene Nephropathie. *Nuklearmedizin* 2010; 49: S59-S63.

Gotthardt M, Dijkgraaf I, Boerman OC, Oyen WJ. Nuclear medicine imaging and therapy of neuroendocrine tumours. *Cancer Imaging* 2006; 6: S178-S184.

Gotthardt M, van Eerd-Vismale J, Oyen WJ, de Jong M, Zhang H, Rolleman E, Maecke HR, Behe M, Boerman O. Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides. *J Nucl Med* 2007; 48: 596-601.

Gradiz R, Silva HC, Carvalho L, Botelho MF, Mota-Pinto A. MIA PaCa-2 and PANC-1-pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Sci Rep* 2016; 6: 21648



Graf F, Fahrer J, Maus S, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Venkatachalam S, Fottner C, Weber MM, Huelsenbeck J, Schreckenberger M, Kaina B, Miederer M. DNA double strand breaks as predictor of efficacy of the alpha-particle emitter Ac-225 and the electron emitter Lu-177 for somatostatin receptor targeted radiotherapy. PLoS One 2014; 9: e88239.

Greene SN, Bright RM. Insulinoma in a cat. J Small Anim Pract 2008; 49: 38-40.

GV-SOLAS (2010) Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT: Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren, [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Tierschutzbeauftragte/Injektionsvol\\_August\\_2010.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierschutzbeauftragte/Injektionsvol_August_2010.pdf), abgerufen am 15.04.2015.

GV-SOLAS (2009) Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT: Kriterien zur vorzeitigen Tötung von Tumortragenden Mäusen und Ratten, [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Tierschutzbeauftragte/tie\\_vorz.toetung2009.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierschutzbeauftragte/tie_vorz.toetung2009.pdf), abgerufen am 02.09.2014.

Haley PJ. Species differences in the structure and function of the immune system. Toxicology 2003; 188: 49-71.

Hashimoto K, Matsuoka H, Uchida S. Production of no-carrier-added  $^{177}\text{Lu}$  via the  $^{176}\text{Yb} (n,\gamma) ^{177}\text{Yb} \rightarrow ^{177}\text{Lu}$  process. J Radioanal Nucl Chem 2003; 255: 575-579.

Hasskarl J, Digel W, Waller CF. Lungenkarzinom. In: Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R (Hrsg.), Das Rote Buch. Hämatologie und Internistische Onkologie. 4. Auflage, Heidelberg, München, Landsberg, Frechen, Hamburg: Hüthig Jehle Rehm, ecomed MEDIZIN 2010: 728-740.

Haubner R, Beer AJ, Wang H, Chen X. Positron emission tomography tracers for imaging angiogenesis. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010; 37: S86-S103.

Haubner R, Maschauer S, Prante O. PET radiopharmaceuticals for imaging integrin expression: tracers in clinical studies and recent developments. Biomed Res Int 2014; 2014: Article ID 871609

Haug AR, Auernhammer CJ, Wängler B, Schmidt GP, Uebleis C, Göke B, Cumming P, Bartenstein P, Tiling R, Hacker M.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE PET/CT for the early prediction of response to somatostatin receptor-mediated radionuclide therapy in patients with well-differentiated neuroendocrine tumors. J Nucl Med 2010; 51: 1349-1356.

Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60: 876-885.

Hawks D, Peterson ME, Hawkins KL, Rosebury WS. Insulin-Secreting Pancreatic (Islet Cell) Carcinoma in a Cat. J Vet Intern Med 1992; 6: 193-196.

Hermann HJ (2004a) Nuklearmedizin. 5. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S.7-64.

Hermann HJ (2004b) Nuklearmedizin. 5. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 201-214.

Herrler T, Wang H, Tischer A, Bartenstein P, Jauch KW, Guba M, Diemling M, Nimmon C, Hacker M. 99mTc-MAG3 scintigraphy for the longitudinal follow-up of kidney function in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury. *EJNMMI Res* 2012; 2:2.

Hofland LJ, Lamberts SWJ. Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann Oncol* 2001; 12: S31-S36.

Hofsli E, Thommesen L, Nørsett K, Falkmer S, Syversen U, Sandvik AK, Lægreid A. Expression of chromogranin A and somatostatin receptors in pancreatic AR42J cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 194: 165-173.

Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 91-100.

Horn L, Pao W, Johnson DH. Lungentumoren. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.), *Harrisons Innere Medizin* 18. Auflage, Berlin: ABW Wissenschaftsverlag 2012: 789-806.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-687.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.

Ilhan H. Evaluierung neuer nephroprotektiver Strategien in einem Mausmodell der strahleninduzierten Nephropathie durch den  $\beta$ -Emitter [Lu-177-DOTA0, TYR3]-octreotate mittels in-vivo Tc-99m-MAG3 Nierenfunktionsszintigraphie. Diss med, München, 2013

Jackson TC, Debey B, Lindbloom-Hawley S, Jones BT, Schermerhorn T. Cellular and molecular characterization of a feline insulinoma. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 383-387.

Jensen RT. Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.), *Harrisons Innere Medizin*. 18. Auflage, Berlin: ABW Wissenschaftsverlag 2012: 3302-3319.

Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 2004; 90: 561-565.

Jubb AM, Strickland LA, Liu SD, Mak J, Schmidt M, Koeppen H. Neuropilin-1 expression in cancer and development. *J Pathol* 2012; 226: 50-60.

Kadonosono T, Yamano A, Goto T, Tsubaki T, Niibori M, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S. Cell penetrating peptides improve tumor delivery of cargos through neuropilin-1-dependent extravasation. *J Control Release* 2015; 201: 14-21.

Kam BL, Teunissen JJ, Krenning EP, de Herder WW, Khan S, van Vliet EI, Kwekkeboom DJ. Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39: S103-S112.

Karstens JH, Janssen S, Werner M, Meyer A, Bruns F, Meier K, Bremer M. Strahlenbiologie. In: Karstens JH, Janssen S, Werner M, Meyer A, Bruns F, Meier K, Bremer M (Hrsg.), *Strahlentherapie und Radioonkologie aus interdisziplinärer Sicht*. 5. Auflage, Berlin: Lehmanns Media 2010: 41-51.

Kenny LM, Coombes RC, Oulie I, Contractor KB, Miller M, Spinks TJ, McParland B, Cohen PS, Hui AM, Palmieri C, Osman S, Glaser M, Turton D, Al-Nahhas A, Aboagye EO. Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp (RGD) peptide radioligand 18F-AH111585 in breast cancer patients. *J Nucl Med* 2008; 49: 879-886.

Kleindienst D, Plitzko G, Wieland C, Born D, Röthlin M. Neuroendokrine Tumoren der Lunge. *Schweiz Med Forum* 2016; 16: 292-298.

Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.) (1996) *Lehrbuch der Physiologie*. 2. Auflage, Stuttgart, New York: Thieme. S. 415-418.

Klöppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18: S1-S16.

Klöppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014: 13-27.

Klöppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P. Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 2007; 451: S9-S27.

Knedlitschke G, Weibezahn KF. Biologische Grundlagen der Strahlenwirkung. In: Schlegel W, Bille J (Hrsg.), *Medizinische Physik 2. Medizinische Strahlenphysik*. 1. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer 2002: 123-135.

Kobe C. Nieren und ableitende Harnwege. In: Schicha H, Schober O (Hrsg.), *Nuklearmedizin. Basiswissen und klinische Anwendung*. 7. Auflage, Stuttgart: Schattauer 2013: 383-393.

Kolbert KS, Watson T, Matei C, Xu S, Koutcher JA, Sgouros G. Murine S factors for liver, spleen, and kidney. *J Nucl Med* 2003; 44: 784-791.

Kölby L, Bernhardt P, Johanson V, Schmitt A, Ahlman H, Forssell-Aronsson E, Mäcke H, Nilsson O. Successful receptor-mediated radiation therapy of xenografted human midgut carcinoid tumour. *Br J Cancer* 2005; 93: 1144-1151.

Komazawa H, Saiki I, Nishikawa N, Yoneda J, Yoo YC, Kojima M, Ono M, Itoh I, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Inhibition of tumor metastasis by Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide conjugated with sulfated chitin derivative, SCM-chitin-RGDS. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11: 482-491.

König HE, Maierl J, Liebich HG. Harnorgane (Organa urinaria). In: König HE, Liebich H-G (Hrsg.), Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 4. Auflage, Stuttgart: Schattauer 2009: 389-404.

Konijnenberg MW. Is the renal dosimetry for [90Y-DOTA0, Tyr3] octreotide accurate enough to predict thresholds for individual patients? Cancer Biother Radiopharm 2003; 18: 619-625.

Konijnenberg MW, Bijster M, Krenning EP, de Jong M. A stylized computational model of the rat for organ dosimetry in support of preclinical evaluations of peptide receptor radionuclide therapy with 90Y, 111In, or 177Lu. J Nucl Med 2004; 45: 1260-1269.

Koppe MJ, Bleichrodt RP, Soede AC, Verhofstad AA, Goldenberg DM, Oyen WJG, Boerman OC. Biodistribution and therapeutic efficacy of 125/131I-, 186Re, 88/90Y-, or 177Lu-labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin. J Nucl Med 2004; 45: 1224-1232.

Kostenich G, Livnah N, Bonasera TA, Yechezkel T, Salitra Y, Litman P, Kimel S, Orenstein A. Targeting small-cell lung cancer with novel fluorescent analogs of somatostatin. Lung Cancer 2005; 50: 319-328.

Kotzerke J, Oehme L. Strahlenbiologie. Sicht der Nuklearmedizin. Nuklearmedizin 2010; 49: S5-S10.

Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, van Hagen M, Postema PT, de Jong M, Reubi JC, Visser TJ, Reijs AE, Hofland LJ, Koper JW, Lamberts SW. Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]-and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. Eur J Nucl Med 1993; 20: 716-731.

Kulaksiz H, Eissele R, Rössler D, Schulz S, Höllt V, Cetin Y, Arnold R. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. Gut 2002; 50: 52-60.

Kusewitt DF, Rush LJ. Neoplasien und Tumorbologie. In: McGavin MD, Zachary JF (Hrsg.), Pathologie der Haustiere. Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. 1. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer 2009: 231-274.

Kwekkeboom DJ, de Herder WW, Kam BL, van Eijck CH, van Essen M, Kooij PP, Feelders RA, van Aken MO, Krenning EP. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0, Tyr3] octreotate: toxicity, efficacy, and survival. J Clin Oncol 2008; 26: 2124-2130.

Kwekkeboom DJ, Kam BL, van Essen M, Teunissen JJ, van Eijck CH, Valkema R, de Jong M, de Herder WW, Krenning EP. Somatostatin receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Endocr Relat Cancer 2010; 17: R53-R73.

Kwekkeboom DJ, Krenning EP, Lebtahi R, Komminoth P, Kos-Kudła B, de Herder WW, Plöckinger U. ENETS consensus guidelines for the standards of care in neuroendocrine tumors: peptide receptor radionuclide therapy with radiolabeled somatostatin analogs. *Neuroendocrinology* 2009; 90: 220-226.

Kwekkeboom DJ, Mueller-Brand J, Paganelli G, Anthony LB, Pauwels S, Kvols LK, O'Dorisio TM, Valkema R, Bodei L, Chinol M, Maecke HR, Krenning EP. Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. *J Nucl Med* 2005; 46: 62S-66S.

Lange D. Physikalisch-technische Grundlagen der Nuklearmedizin. In: Schlegel W, Bille J (Hrsg.), *Medizinische Physik 2. Medizinische Strahlenphysik*. 1. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer 2002: 171-210.

Lewin J, Cullinane C, Akhurst T, Waldeck K, Watkins DN, Rao A, Eu P, Mileschkin L, Hicks RJ. Peptide receptor chemoradionuclide therapy in small cell carcinoma: from bench to bedside. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015; 42: 25-32.

Lewis JS, Wang M, Laforest R, Wang F, Erion JL, Bugaj JE, Srinivasan A, Anderson CJ. Toxicity and dosimetry of <sup>177</sup>Lu-DOTA-Y3-octreotate in a rat model. *Int J Cancer* 2001; 94: 873-877.

Liang H, Kimberly R, David M, Itz A, Clifford C. Abstract# 3218: Characterization of a new hairless SCID murine model. *Cancer Res* 2009; 69: 3218.

Liapis H, Adler LM, Wick MR, Rader JS. Expression of  $\alpha v \beta 3$  integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 1997; 28: 443-449.

Lloyd RV. Practical markers used in the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 2003; 14: 293-301.

Longnecker DS, Curphey TJ. Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats. *Cancer Res* 1975; 35: 2249-2258.

Loevinger R, Berman M. A formalism for calculation of absorbed dose from radionuclides. *Phys Med Biol* 1968; 13: 205-217.

Maas OC, Forrer F. Ga-68-DOTATOC-PET/CT – ein neuer Standard zur Diagnostik von Somatostatinrezeptor-positiven Tumoren. *Schweiz Med Forum* 2011; 11: 11-13.

Macaulay VM, Smith IE, Everard MJ, Teale JD, Reubi JC, Millar JL. Experimental and clinical studies with somatostatin analogue octreotide in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 451-456.

Maecke HR, Reubi JC. Somatostatin receptors as targets for nuclear medicine imaging and radionuclide treatment. *J Nucl Med* 2011; 52: 841-844.

Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 319-328.

Majda JA, Gerner EW, Vanlandingham B, Gehlsen KR, Cress AE. Heat shock-induced shedding of cell surface integrins in A549 human lung tumor cells in culture. *Exp Cell Res* 1994; 210: 46-51.

Mariniello A, Bodei L, Tinelli C, Baio SM, Gilardi L, Colandrea M, Papi S, Valmadre G, Fazio N, Galetta D, Paganelli G, Grana CM. Long-term results of PRRT in advanced bronchopulmonary carcinoid. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016; 43: 441-452.

Marshall JF, Hart IR. The role of  $\alpha$ v-integrins in tumour progression and metastasis. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 129-138.

Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986; 46: 6387-6392.

Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004; 172: 2731-2738.

Miederer M, Henriksen G, Alke A, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Senekowitsch-Schmidtke R, Essler M. Preclinical evaluation of the  $\alpha$ -particle generator nuclide  $^{225}\text{Ac}$  for somatostatin receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3555-3561.

Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* 2006; 17: v7-v12.

Moch H, Höfler HK, Lax S, Moll R, Tannapfel A, Zimmermann D. Tumorerkrankungen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.), *Pathologie*. 5. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer 2012: 123-169.

Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003; 97: 934-959.

Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI. Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 169-188.

Möstl E. Spezielle Endokrinologie. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. 2. Auflage, Stuttgart: MVS Medizinverlage, Enke 2005: 477-494.

Myers RK, McGavin MD. Schädigung von Zellen und Geweben. In: McGavin MD, Zachary JF (Hrsg.), *Pathologie der Haustiere*. Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. 1. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer 2009: 3-59.

Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S. Clinical significance of  $\alpha\text{v}\beta 3$  integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 1997; 57: 1554-1560.

Nelson RW, Couto CG (Hrsg.) (2010a) *Innere Medizin der Kleintiere*. 2. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 831-838.

Nelson RW, Couto CG (Hrsg.) (2010b) *Innere Medizin der Kleintiere*. 2. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 643-645.

Nelson RW, Couto CG (Hrsg.) (2010c) *Innere Medizin der Kleintiere*. 2. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 523.

Nelson RW, Couto CG (Hrsg.) (2010d) *Innere Medizin der Kleintiere*. 2. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer. S. 1267-1268.

Newman SJ, Confer AW, Panciera RJ. Harnorgane. In: McGavin MD, Zachary JF (Hrsg.), *Pathologie der Haustiere*. Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. 1. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer 2009: 571-642.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere* Band 2. Eingeweide. 9. Auflage, Stuttgart: MVS Medizinverlage, Parey. S. 138-142.

Nip J, Shibata H, Loskutoff DJ, Cheresch DA, Brodt P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin  $\alpha\text{v}\beta 3$  to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest* 1992; 90: 1406-1413.

O'Toole D, Hentic O, Corcos O, Ruzsiewicz P. Chemotherapy for gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 79-84.

O'Toole D, Salazar R, Falconi M, Kaltsas G, Couvelard A, de Herder WW, Hyrdel R, Nikou G, Krenning E, Vullierme MP, Caplin M, Jensen R, Eriksson B. Rare functioning pancreatic endocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2006; 84: 189-195.

Öberg K. Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours. *Ann Oncol* 2001; 12: S111-S114.

Onn A, Isobe T, Itasaka S, Wu W, O'Reilly MS, Hong WK, Fidler IJ, Herbst RS. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5532-5539.

Oshiro Y, Kusumoto M, Matsuno Y, Asamura H, Tsuchiya R, Terasaki H, Takei H, Maeshima A, Murayama S, Moriyama N. CT findings of surgically resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung in 38 patients. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 87-91.

Pape UF, Berndt U, Müller-Nordhorn J, Böhmig M, Roll S, Koch M, Willich SN, Wiedenmann B. Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 1083-1097.

Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 157-198.

Patel YC, Srikant CB. Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 1997; 8: 398-405.

Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 273-284.

Petitclerc E, Strömblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresch DA, Brooks PC. Integrin  $\alpha\beta 3$  promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* 1999; 59: 2724-2730.

Plöckinger U, Rindi G, Arnold R, Eriksson B, Krenning EP, de Herder WW, Goede A, Caplin M, Öberg K, Reubi JC, Nilsson O, Delle Fave G, Ruszniewski P, Ahlman H, Wiedenmann B. Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 394-424.

Poeppel TD, Binse I, Petersenn S, Lahner H, Schott M, Antoch G, Brandau W, Bockisch A, Boy C.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC versus  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE PET/CT in functional imaging of neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2011; 52: 1864-1870.

Poeppel TD, Boy C, Bockisch A, Kotzerke J, Buchmann I, Ezziddin S, Scheidhauer K, Krause BJ, Schmidt D, Amthauer H, Rösch F, Nagarajah J, Führer D, Lahner H, Pöppel G, Hörsch D, Walter MA, Baum RP. Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie Somatostatinrezeptor-exprimierender Tumore. DGN-Leitlinie (S1)\*. *Nuklearmedizin* 2015; 54: 1-11.

Polton G, White RN, Brearley MJ, Eastwood JM. Improved survival in a retrospective cohort of 28 dogs with insulinoma. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 151-156.

Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A. N-terminally extended somatostatin: The primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 1980; 109: 55-58.

Reardon DA, Cheresch D. Cilengitide: a prototypic integrin inhibitor for the treatment of glioblastoma and other malignancies. *Genes Cancer* 2011; 2: 1159-1165.

Reubi JC. Peptide receptor expression in GEP-NET. *Virchows Arch* 2007; 451: S47-S50.

Reubi JC, Schär JC, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS, Mäcke HR. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1–SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 273-282.



Reubi JC, Waser B. Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 781-793.

Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1–sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 836-846.

Reubi JC, Waser B, Sheppard M, Macaulay V. Somatostatin receptors are present in small-cell but not in non-small-cell primary lung carcinomas: Relationship to EGF-receptors. *Int J Cancer* 1990; 45: 269-274.

Rindi G, Azzoni C, La Rosa S, Klersy C, Paolotti D, Rappel S, Stolte M, Capella C, Bordi C, Solcia E. ECL cell tumor and poorly differentiated endocrine carcinoma of the stomach: prognostic evaluation by pathological analysis. *Gastroenterology* 1999; 116: 532-542.

Rindi G, Falconi M, Klersy C, Albarello L, Boninsegna L, Buchler MW, Capella C, Caplin M, Couvelard A, Doglioni C, Delle Fave G, Fischer L, Fusai G, de Herder WW, Jann H, Komminoth P, de Krijger RR, La Rosa S, Luong TV, Pape U, Perren A, Ruzsniwski P, Scarpa A, Schmitt A, Solcia E, Wiedenmann B. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 764-777.

Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of foregut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006; 449: 395-401.

Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007; 451: 757-762.

Rinke A, Arnold R. Aktuelle Therapie neuroendokriner Tumoren. *Arzneimitteltherapie* 2014; 32: 2-13.

Robben JH, Pollak YW, Kirpensteijn J, Boroffka SA, van den Ingh TS, Teske E, Voorhout G. Comparison of ultrasonography, computed tomography, and single-photon emission computed tomography for the detection and localization of canine insulinoma. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 15-22.

Robben JH, Visser-Wisselaar HA, Rutteman GR, van Rijk PP, van Dongen AJ, Voorhout G, van den Ingh TS, Hofland LJ, Lamberts SW. In vitro and in vivo detection of functional somatostatin receptors in canine insulinomas. *J Nucl Med* 1997; 38: 1036-1042.

Roberts J, Chen B, Curtis LM, Agarwal A, Sanders PW, Zinn KR. Detection of early changes in renal function using 99mTc-MAG3 imaging in a murine model of ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F1408-F1412.

Rolleman EJ, Bernard BF, Breeman WAP, Forrer F, de Blois E, Hoppin J, Gotthardt M, Boerman OC, Krenning EP, de Jong M. Molecular imaging of reduced renal uptake of radiolabelled [DOTA0, Tyr3] octreotate by the combination of lysine and Gelofusine in rats\*. *Nuklearmedizin* 2008; 47: 110-115.

Rolleman EJ, Forrer F, Bernard B, Bijster M, Vermeij M, Valkema R, Krenning EP, de Jong M. Amifostine protects rat kidneys during peptide receptor radionuclide therapy with [177Lu-DOTA0, Tyr3] octreotate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007a; 34: 763-771.

Rolleman EJ, Kooij PP, de Herder WW, Valkema R, Krenning EP, de Jong M. Somatostatin receptor subtype 2-mediated uptake of radiolabelled somatostatin analogues in the human kidney. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007b; 34: 1854-1860.

Rolleman EJ, Krenning EP, Bernard BF, de Visser M, Bijster M, Visser TJ, Vermeij M, Lindemans J, de Jong M. Long-term toxicity of [177Lu-DOTA0, Tyr3] octreotate in rats. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007c; 34: 219-227.

Rolleman EJ, Melis M, Valkema R, Boerman OC, Krenning EP, de Jong M. Kidney protection during peptide receptor radionuclide therapy with somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37: 1018-1031.

Rolleman EJ, Valkema R, de Jong M, Kooij PP, Krenning EP. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 9-15.

Rosewicz S, Riecken EO, Wiedenmann B. The amphicrine pancreatic cell line AR42J: a model system for combined studies on exocrine and endocrine secretion. *Clin Invest* 1992; 70: 205-209.

Roth L, Agemy L, Kotamraju VR, Braun G, Teesalu T, Sugahara KN, Hamzah J, Ruoslahti E. Transtumoral targeting enabled by a novel neuropilin-binding peptide. *Oncogene* 2012; 31: 3754-3763.

Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 83-90.

Ruoslahti E. The RGD story: a personal account. *Matrix Biol* 2003; 22: 459-465.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491-497.

Rutland M, Que L, Hassan IM. "FUR"—one size suits all. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 1708-1713.

Salomon FV, Geyer H, Gille U (Hrsg.) (2004) *Anatomie für die Tiermedizin*. 1. Auflage, Stuttgart: MVS Medizinverlage, Enke. S. 321-323.

Sauer R. Strahlenbiologie. In: Sauer R, Strahlentherapie und Onkologie. 5. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer 2010: 103-128.

Scharrer E, Wolffram S. Funktionen des Dünndarms und seiner Anhangsdrüsen. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), Physiologie der Haustiere 2. Auflage, Stuttgart: MVS Medizinverlage, Enke 2005: 380-405.

Schicha H, Schober O (Hrsg.) (2013a) Nuklearmedizin. Basiswissen und klinische Anwendung. 7. Auflage, Stuttgart: Schattauer. S. 3-131.

Schicha H, Schober O (Hrsg.) (2013b) Nuklearmedizin. Basiswissen und klinische Anwendung. 7. Auflage, Stuttgart: Schattauer. S. 268-269.

Schlegel W, Bille J (Hrsg.) (2002a) Medizinische Physik 2. Medizinische Strahlenphysik. 1. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer. S. 3-43.

Schlegel W, Bille J (Hrsg.) (2002b) Medizinische Physik 2. Medizinische Strahlenphysik. 1. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer. S. 419-421.

Schmitt A, Bernhardt P, Nilsson O, Ahlman H, Kölby L, Maecke HR, Forssell-Aronsson E. Radiation therapy of small cell lung cancer with <sup>177</sup>Lu-DOTA-Tyr3-octreotate in an animal model. J Nucl Med 2004; 45: 1542-1548.

Schmitt A, Bernhardt P, Nilsson O, Ahlman H, Kölby L, Schmitt J, Forssell-Aronsson E. Biodistribution and dosimetry of <sup>177</sup>Lu-labeled [DOTA0, Tyr3] octreotate in male nude mice with human small cell lung cancer. Cancer Biother Radiopharm 2003; 18: 593-599.

Schmitz S (2011) Der Experimentator: Zellkultur. 3. Auflage, Heidelberg: Springer, Spektrum Akademischer Verlag. S. 71-76.

Schnell O, Krebs B, Wagner E, Romagna A, Beer AJ, Grau SJ, Thon N, Goetz C, Kretschmar HA, Tonn JC, Goldbrunner RH. Expression of integrin  $\alpha v \beta 3$  in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. Brain Pathol 2008; 18: 378-386.

Shaw DH. Gastrinoma (Zollinger-Ellison Syndrome) in the dog and cat. Can Vet J 1988; 29: 448-452.

Silbernagl S. Die Funktion der Nieren. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.), Lehrbuch der Physiologie. 2. Auflage, Stuttgart, New York: Thieme 1996: 283-330.

Sinowatz F, Hees H. (2006) Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 4. Auflage, München: Eigenverlag. S. 205-227.

Sollini M, Farioli D, Froio A, Chella A, Asti M, Boni R, Grassi E, Roncali M, Versari A, Erba PA. Brief report on the use of radiolabeled somatostatin analogs for the diagnosis and treatment of metastatic small-cell lung cancer patients. J Thorac Oncol 2013; 8: 1095-1101.

Staton CA, Kumar I, Reed MWR, Brown NJ. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. J Pathol 2007; 212: 237-248.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A. An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression. *Neuroendocrinology* 2008; 87: 233-242.

Strömblad S, Cheresh DA. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol* 1996; 3: 881-885.

Sugahara KN, Braun GB, de Mendoza TH, Kotamraju VR, French RP, Lowy AM, Teesalu T, Ruoslahti E. Tumor-penetrating iRGD peptide inhibits metastasis. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 120-128.

Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Girard OM, Hanahan D, Mattrey RF, Ruoslahti E. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* 2009; 16: 510-520.

Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, Ruoslahti E. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 2010; 328: 1031-1035.

Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65: 157-170.

Taga T, Suzuki A, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH, Stins M, Shimada H, Barsky L, Weinberg KI, Laug WE.  $\alpha$ v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer* 2002; 98: 690-697.

Tantawy MN, Jiang R, Wang F, Takahashi K, Peterson TE, Zemel D, Hao CM, Fujita H, Harris RC, Quarles CC, Takahashi T. Assessment of renal function in mice with unilateral ureteral obstruction using 99mTc-MAG3 dynamic scintigraphy. *BMC Nephrol* 2012; 13: 168.

Taylor JE, Bogden AE, Moreau JP, Coy DH. In vitro and in vivo inhibition of human small cell lung carcinoma (NCI-H69) growth by a somatostatin analogue. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 81-86.

Taylor JE, Theveniau MA, Bashirzadeh R, Reisine T, Eden PA. Detection of somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) in established tumors and tumor cell lines: evidence for SSTR2 heterogeneity. *Peptides* 1994; 15: 1229-1236.

Teesalu T, Sugahara KN, Kotamraju VR, Ruoslahti E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 16157-16162.

Teesalu T, Sugahara KN, Ruoslahti E. Tumor-penetrating peptides. *Front Oncol* 2013; 3: 216.

Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 131-135.

Travis WD. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol* 2010; 21: vii65-vii71.

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 1243-1260.

Valkema R, Pauwels SA, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Jamar F, de Jong M, Barone R, Walrand S, Kooij PP, Bakker WH, Lasher J, Krenning EP. Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with 90Y-DOTA0, Tyr3-octreotide and 177Lu-DOTA0, Tyr3-octreotate. *J Nucl Med* 2005; 46: 83S-91S.

Vegt E, de Jong M, Wetzels JF, Masereeuw R, Melis M, Oyen WJ, Gotthardt M, Boerman OC. Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J Nucl Med* 2010; 51: 1049-1058.

Viguerie N, Tahiri-Jouti N, Esteve JP, Clerc P, Logsdon C, Svoboda M, Susini C, Vaysse N, Ribet A. Functional somatostatin receptors on a rat pancreatic acinar cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1988; 255: G113-G120.

Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, Baum RP, Fanti S, Gabriel M, Papathanasiou ND, Pepe G, Oyen W, de Cristoforo C, Chiti A. Procedure guidelines for pet/ct tumour imaging with 68Ga-dota-conjugated peptides: 68Ga-dota-toc, 68Ga-dota-noc, 68Ga-dota-tate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37: 2004-2010.

Voigt K. Endokrines System. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.), *Lehrbuch der Physiologie*. 2. Auflage, Stuttgart, New York: Thieme 1996: 435-508.

Waser B, Tamma ML, Cescato R, Maecke HR, Reubi JC. Highly efficient in vivo agonist-induced internalization of sst2 receptors in somatostatin target tissues. *J Nucl Med* 2009; 50: 936-941.

Weinberg RA (2007a) *The biology of cancer*. 1th edn, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. S. 527-654.

Weinberg RA (2007b) *The biology of cancer*. 1th edn, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. S. 241-246.

Weinberg RA (2007c) *The biology of cancer*. 1th edn, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. S. 147-150.

Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3500-3504.

Woodard G. Principles in drug administration. In: Gay WI (Ed.) Methods of animal experimentation. Vol. 1. 1th edn, New York, London: Academic Press 1965: 343-359.

Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3063-3072.

Yu KF, Zhang WQ, Luo LM, Song P, Li D, Du R, Ren W, Huang D, Lu WL, Zhang X, Zhang Q. The antitumor activity of a doxorubicin loaded, iRGD-modified sterically-stabilized liposome on B16-F10 melanoma cells: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 2473-2485.

Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 1995; 55: 3752-3756.

Zaknun JJ, Bodei L, Mueller-Brand J, Pavel ME, Baum RP, Hörsch D, O’Dorisio MS, O’Dorisiol TM, Howe JR, Cremonesi M, Kwekkeboom DJ. The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRNT) in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40: 800-816.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Veranschaulichung der WHO-Klassifizierung der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien und des angewendeten Grading-Systems.....	6
Abbildung 2: Einteilung neuroendokriner Lungentumoren.....	7
Abbildung 3: Aufbau der nativen Somatostatinmoleküle Somatostatin-14 und Somatostatin-28 .....	20
Abbildung 4: Struktureller Vergleich synthetischer Somatostatinanaloga.....	21
Abbildung 5: Schritte des iRGD-vermittelten Internalisierungsprozesses mit der vermuteten energieabhängigen Endozytose .....	36
Abbildung 6: Paarweise Platzierung der Mäuse auf einem Detektorkopf der Philips-Prism 3000 XP Drei-Kopf-y-Kamera.....	59
Abbildung 7: Szintigraphische Aufnahme zur Überprüfung der Nierenfunktion einer mit $^{99m}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> applizierten Maus.....	60
Abbildung 8: Unterschied zwischen der Fractional Uptake Rate (Rutland-Patlak Plot) und dem neuen kinetischen Modell mit der korrigierten Aufnahmerate und der tubulären Exkretionsrate.....	61
Abbildung 9: Funktionen zur Generierung der Werte für die korrigierte Aufnahmerate und tubuläre Exkretionsrate am Beispiel einer rechten Niere einer mit $^{99m}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> applizierten Maus.....	62
Abbildung 10: Renogramm-Kurven und Fit der Hintergrundkorrektur für beide Nieren einer mit $^{99m}\text{Tc}$ -MAG <sub>3</sub> applizierten Maus .....	63
Abbildung 11: Maus mit blutreichem AR42J-Flankentumor.....	73
Abbildung 12: NCI-H69-Flankentumoren.....	74
Abbildung 13: $\mu\text{PET}$ -Aufnahmen mit $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-iRGD an tumortragenden Mäusen .....	75
Abbildung 14: Balkendiagramm zur Aktivitätsanreicherung in linken und rechten Nieren sowie in den NCI-H69-Tumoren bei Mäusen.....	77
Abbildung 15: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in beiden Nieren bei NCI-H69-tumortragenden Mäusen .....	78
Abbildung 16: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in den NCI-H69-Tumoren bei Mäusen.....	78

Abbildung 17: Balkendiagramm zur Aktivitätsanreicherung in linken und rechten Nieren sowie in den AR42J-Tumoren bei Mäusen.....	81
Abbildung 18: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in beiden Nieren bei AR42J-tumortragenden Mäusen.....	81
Abbildung 19: Liniendiagramm zum Verlauf der Aktivitätsanreicherung in den AR42J-Tumoren bei Mäusen.....	82
Abbildung 20: Absolute Volumenänderung der Tumoren im Therapieversuch I bis Tag 22 in den Therapiegruppen und bis Tag 18 in der Kontrollgruppe .....	84
Abbildung 21: Gegenüberstellung der korrigierten Aufnahmerate (A) und tubulären Exkretionsrate (B) der beiden Therapiegruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt im Therapieversuch I.....	87
Abbildung 22: Renogramm-Kurven aus den Daten von Baseline- und posttherapeutischen Nierenszintigraphien der Mäuse beider Therapiegruppen im Therapieversuch I.....	89
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Mäuse der jeweiligen Gruppen im Therapieversuch I.....	92
Abbildung 24: Absolute Volumenänderung der Tumoren im Therapieversuch II bis Tag 26 in den Therapiegruppen und bis Tag 16 in der Kontrollgruppe .....	94
Abbildung 25: Gegenüberstellung der korrigierten Aufnahmerate (A) und tubulären Exkretionsrate (B) der beiden Therapiegruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt im Therapieversuch II.....	97
Abbildung 26: Renogramm-Kurven aus den Daten von Baseline- und posttherapeutischen Nierenszintigraphien der Mäuse beider Therapiegruppen im Therapieversuch II.....	98
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Mäuse der jeweiligen Gruppen im Therapieversuch II.....	101
Abbildung 28: Absolute Volumenänderung der Tumoren im Therapieversuch III bis Tag 37 in den Therapiegruppen und bis Tag 16 in der Kontrollgruppe .....	103
Abbildung 29: Gegenüberstellung der korrigierten Aufnahmerate (A) und Exkretionsrate (B) der beiden Therapiegruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt im Therapieversuch III.....	106



Abbildung 30: Renogramm-Kurven aus den Daten von Baseline- und posttherapeutischen Nierenszintigraphien der Mäuse beider Therapiegruppen im Therapieversuch III.....	107
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Mäuse der jeweiligen Gruppen im Therapieversuch III.....	111
Abbildung 32: Histologische Normal- bzw. Hintergrundbefunde der Nieren der Mäuse der Referenzgruppe.....	112
Abbildung 33: Histopathologische Befunde in den Nieren nach erfolgter Therapie mit <sup>177</sup> Lu-DOTATOC im Therapieversuch III.....	113
Abbildung 34: Population a und b der NCI-H69-Zellen im FSC- und SSC-Kanal.....	181
Abbildung 35: Diagramme zur Fluoreszenz der NCI-H69-Zellen mit fluoreszenzmarkiertensstr2- (A, B) undsstr5-Antikörpern (C, D) im Vergleich zu Kontrollantikörper.....	182
Abbildung 36: Population der MIA PaCa-2-Zellen im FSC- und SSC-Kanal...	183
Abbildung 37: Diagramme zur Fluoreszenz der MIA PaCa-2-Zellen mit fluoreszenzmarkiertensstr2- (A) undsstr5-Antikörpern (B) im Vergleich zu Kontrollantikörper.....	183
Abbildung 38: Population der BON1-Zellen im FSC- und SSC-Kanal.....	184
Abbildung 39: Diagramme zur Fluoreszenz der BON1-Zellen mit fluoreszenzmarkiertensstr2- (A) undsstr5-Antikörpern (B) im Vergleich zu Kontrollantikörper.....	184

## **X. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Somatostatinrezeptor-Subtypen.....	5
Tabelle 2: Prozentuales Vorkommen von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren innerhalb der neuroendokrinen Tumoren des Verdauungstraktes.....	9
Tabelle 3: Übersicht der funktionellen endokrinen Zellen des Pankreas.....	10
Tabelle 4: Prozentuales Vorkommen der funktionellen neuroendokrinen Tumoren im Pankreas .....	11
Tabelle 5: Applikationsschema der Koinjektion mit iRGD und NaCl-Lösung bei den Mäusen der beiden Therapiegruppen.....	70
Tabelle 6: Semiquantitatives Scoringssystem zur Beurteilung der histopathologischen Nierenbefunde im Therapieversuch III.....	72
Tabelle 7: Mittelwerte mit Standardabweichung für Nieren und NCl-H69-Tumoren in [%ID/g] und Tumor-Muskel-Verhältnis bei Mäusen.....	77
Tabelle 8: Relative Dosiswerte für NCl-H69-Tumoren und Nieren bei Mäusen sowie prozentualer Vergleich der Werte zwischen den Gruppen, bezogen auf die Gruppe mit iRGD als Koinjektion.....	79
Tabelle 9: Mittelwerte mit Standardabweichung für Nieren und AR42J-Tumoren in [%ID/g] und Tumor-Muskel-Verhältnis bei Mäusen.....	80
Tabelle 10: Relative Dosiswerte von AR42J-Tumoren und Nieren bei Mäusen sowie prozentualer Vergleich der Werte zwischen den Gruppen, bezogen auf Gruppe mit iRGD als Koinjektion.....	82
Tabelle 11: Absolute Volumenänderung der Tumoren der verschiedenen Gruppen je Messzeitpunkt im Therapieversuch I.....	84
Tabelle 12: Verschiedene Gewichtsparameter der Mäuse im Therapieversuch I.....	85
Tabelle 13: Mittelwerte mit Standardabweichung zur korrigierten Aufnahmerate und zur tubulärer Exkretionsrate im Therapieversuch I.....	87
Tabelle 14: Zahlenwerte (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen) für Peak %ID und TTP zu den Renogramm-Kurven im Therapieversuch I.....	89

Tabelle 15: Blutwerte der therapierten Mäuse im Therapieversuch I inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe .....	90
Tabelle 16: Anzahl euthanasierter Mäuse und prozentualer Anteil der überlebenden Mäuse je Gruppe und Zeitpunkt im Therapieversuch I....	91
Tabelle 17: Absolute Volumenänderung der Tumoren der verschiedenen Gruppen je Messzeitpunkt im Therapieversuch II.....	93
Tabelle 18: Verschiedene Gewichtsparameter der Mäuse im Therapieversuch II.....	95
Tabelle 19: Mittelwerte mit Standardabweichung zu korrigierten Aufnahmerate und zur tubulären Exkretionsrate im Therapieversuch II.....	96
Tabelle 20: Zahlenwerte (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen) für Peak %ID und TTP zu den Renogramm-Kurven im Therapieversuch II.....	98
Tabelle 21: Blutwerte der therapierten Mäuse im Therapieversuch II inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe.....	99
Tabelle 22: Anzahl euthanasierter Mäuse und prozentualer Anteil der überlebenden Mäuse je Gruppe und Zeitpunkt im Therapieversuch II.....	100
Tabelle 23: Absolute Volumenänderung der Tumoren der verschiedenen Gruppen je Messzeitpunkt im Therapieversuch III.....	103
Tabelle 24: Verschiedene Gewichtsparameter der Mäuse im Therapieversuch III.....	104
Tabelle 25: Mittelwerte mit Standardabweichung zur korrigierten Aufnahmerate und zur tubulären Exkretionsrate im Therapieversuch III.....	105
Tabelle 26: Zahlenwerte (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen) für Peak %ID und TTP zu den Renogramm-Kurven im Therapieversuch III.....	107
Tabelle 27: Blutwerte der therapierten Mäuse im Therapieversuch III inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe.....	108
Tabelle 28: Blutaussstriche der therapierten Mäuse im Therapieversuch III inklusive prozentualer Verteilung der Mäuseanzahl je Therapiegruppe.....	109

---

Tabelle 29: Anzahl euthanasierter Mäuse und prozentualer Anteil der überlebenden Mäuse je Gruppe und Zeitpunkt im Therapieversuch III.....	110
Tabelle 30: Gemessene Fluoreszenzen der ssr im Vergleich zu den Kontrollantikörpern und berechneter Mean Fluorescence Intensity Ratio bei den NCI-H69-Zellen.....	182
Tabelle 31: Gemessene Fluoreszenzen der ssr im Vergleich zu den Kontrollantikörpern und berechneter Mean Fluorescence Intensity Ratio bei den MIA PaCa-2-Zellen.....	183
Tabelle 32: Gemessene Fluoreszenzen der ssr im Vergleich zu den Kontrollantikörpern und berechneter Mean Fluorescence Intensity Ratio bei den BON1-Zellen.....	184

## **XI. ANHANG**

### **Fluorescence-activated cell sorting (FACS)**

Die FACS-Untersuchung, die Fluoreszenzmarkierung der Somatostatinantikörper sowie die Einschätzung der Ergebnisse erfolgte in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Zeidler im Helmholtz Zentrum München, Deutschland.

Eingesetzte Antikörper (R&D Systems GmbH, Wiesbaden):

Human Somatostatin R2/SSTR2 Antibody (Monoclonal Mouse IgG2A)

Human Somatostatin R5/SSTR5 Antibody (Monoclonal Mouse IgG1)

#### **Begriffserklärung:**

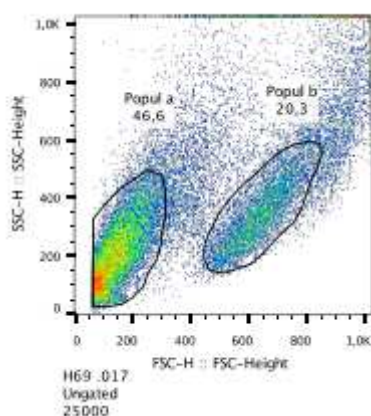
Population: Bereich in dem sich der Großteil der lebenden Zellen befand

FSC: Forward Scatter = Vorwärtstreulicht, Größe der Zellen

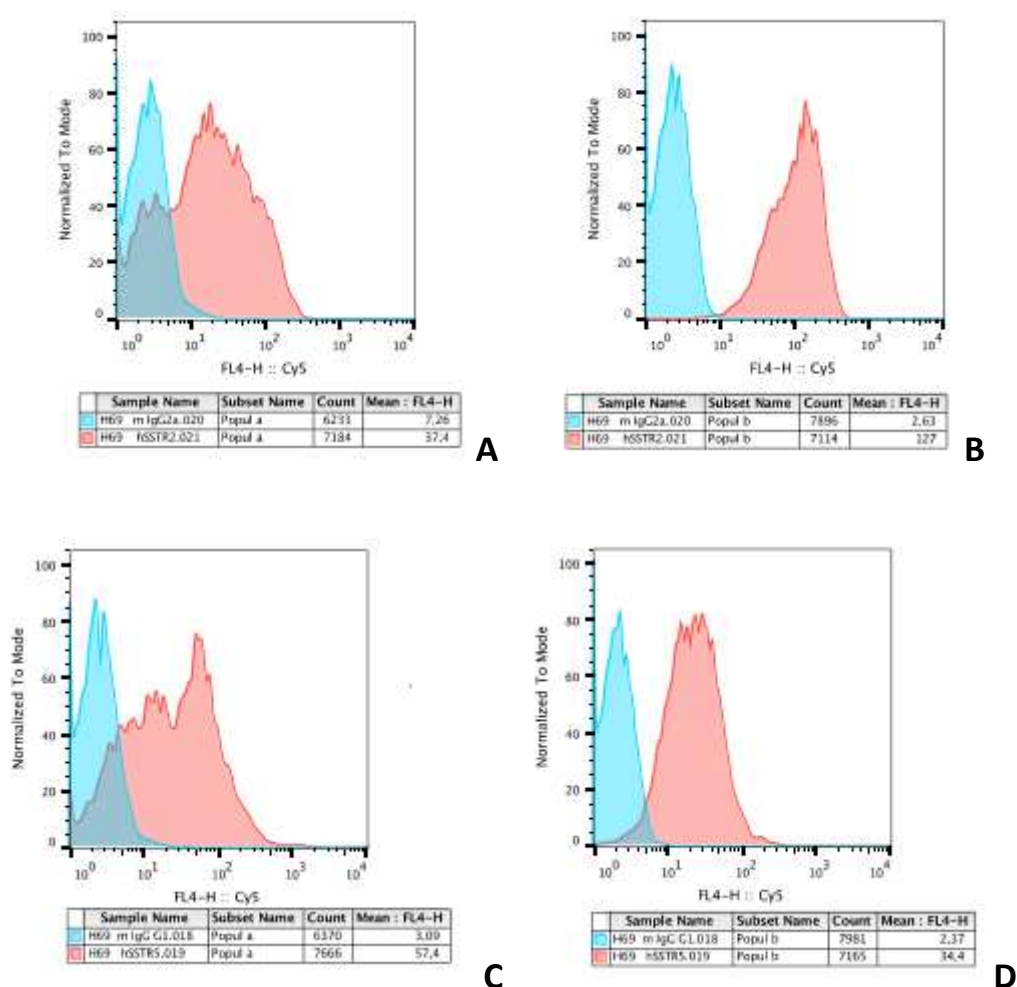
SSC: Side Scatter = Seitwärtstreulicht, Granularität der Zellen

Mean Fluorescence Intensity Ratio: ermöglicht quantitative Einschätzung der sstr

### **FACS der NCI-H69-Zellen**



**Abbildung 34: Population a und b der NCI-H69-Zellen im FSC- und SSC-Kanal**



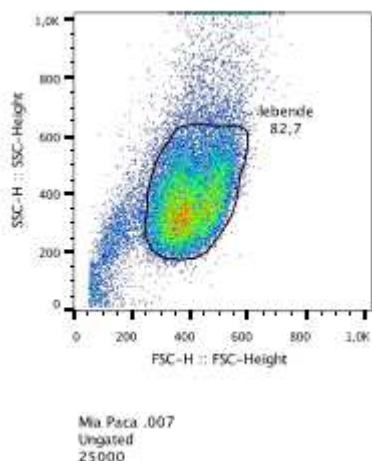
**Abbildung 35: Diagramme zur Fluoreszenz der NCI-H69-Zellen mit fluoreszenzmarkierten sstr2- (A, B) und sstr5-Antikörpern (C, D) im Vergleich zu Kontrollantikörper**

**Tabelle 30: Gemessene Fluoreszenzen der sstr im Vergleich zu den Kontrollantikörpern und berechneter Mean Fluorescence Intensity Ratio bei den NCI-H69-Zellen**

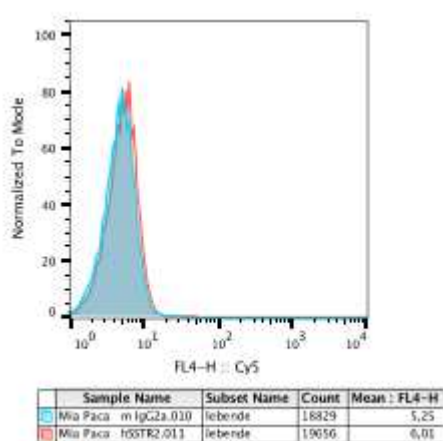
Antikörper	Gemessene Fluoreszenz		Mean Fluorescence Intensity Ratio	
	Population a	Population b	Population a	Population b
sstr2	37,4	127	5,15	48,2
Kontrollantikörper	7,26	2,63		
sstr5	57,4	34,4	18,44	14,5
Kontrollantikörper	3,09	2,37		

Die NCI-H69-Zellen wurden als positiv für sstr2 und sstr5 eingeschätzt.

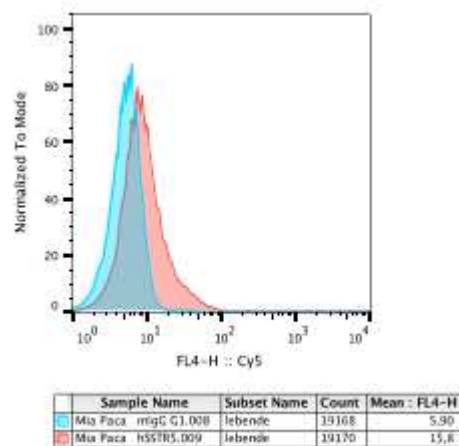
### FACS der MIA PaCa-2-Zellen



**Abbildung 36: Population der MIA PaCa-2-Zellen im FSC- und SSC-Kanal**



A



B

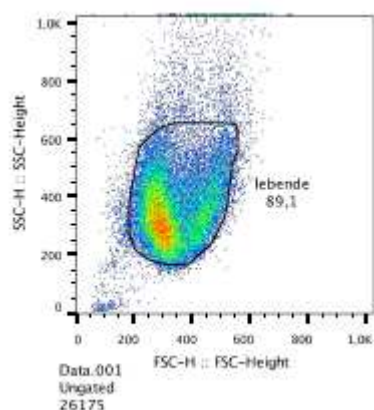
**Abbildung 37: Diagramme zur Fluoreszenz der MIA PaCa-2-Zellen mit fluoreszenzmarkierten sstr2- (A) und sstr5-Antikörpern (B) im Vergleich zu Kontrollantikörper**

**Tabelle 31: Gemessene Fluoreszenzen der sstr im Vergleich zu den Kontrollantikörpern und berechneter Mean Fluorescence Intensity Ratio bei den MIA PaCa-2-Zellen**

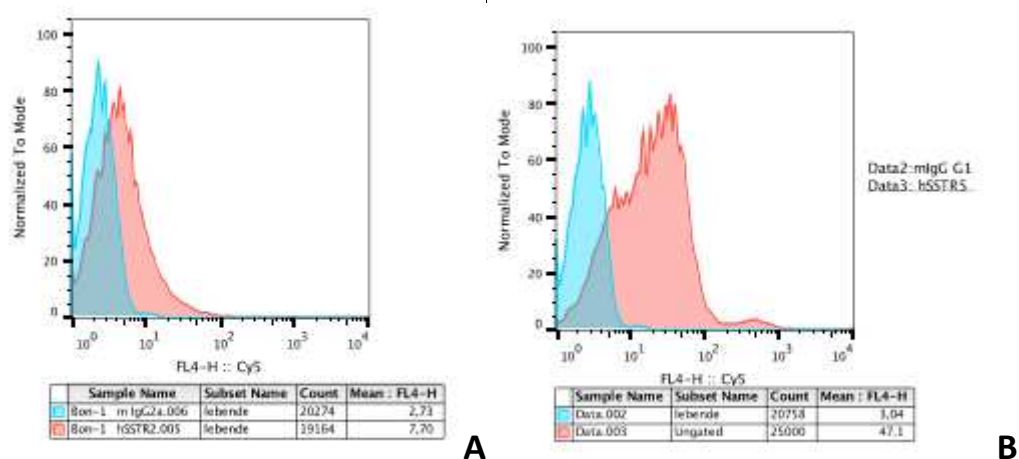
Antikörper	Gemessen Fluoreszenz	Mean Fluorescence Intensity Ratio
sstr2	6,01	1,14
Kontrollantikörper	5,25	
sstr5	15,8	2,67
Kontrollantikörper	5,90	

Die MIA PaCa-2-Zellen wurden als negativ für sstr2 und sehr schwach positiv für sstr5 eingeschätzt.

### FACS der BON1-Zellen



**Abbildung 38: Population der BON1-Zellen im FSC- und SSC-Kanal**



**Abbildung 39: Diagramme zur Fluoreszenz der BON1-Zellen mit fluoreszenzmarkierten sstr2- (A) und sstr5-Antikörpern (B) im Vergleich zu Kontrollantikörper**

**Tabelle 32: Gemessene Fluoreszenzen der sstr im Vergleich zu den Kontrollantikörpern und berechneter Mean Fluorescence Intensity Ratio bei den BON1-Zellen**

Antikörper	Gemessen Fluoreszenz	Mean Fluorescence Intensity Ratio
sstr2	7,70	2,82
Kontrollantikörper	2,73	
sstr5	47,1	15,49
Kontrollantikörper	3,04	

Die BON1-Zellen wurden als schwach positiv für sstr2 und positiv für sstr5 eingeschätzt.



## **XII. DANKSAGUNG**

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Janette Carlsen, die es mir ermöglicht hat meine Dissertation unter ihrer Anleitung anzufertigen. Ihr größtes Anliegen ist stets der Tierschutz, das Wohl und die Wertschätzung eines jeden Tieres, das sich bei der Planung und Durchführung der Versuche als eines der wichtigsten Kriterien widerspiegelte. Ich danke ihr daher ganz besonders für diese Einstellung, und dass jede Versuchsmaus auch als Individuum gesehen werden darf, dessen Wohlbefinden oberste Priorität hat.

Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger gilt mein besonderer Dank dafür, dass er die Aufgabe der Betreuung meiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät übernommen hat.

Frau Rosel Oos verdient meinen ganz speziellen Dank für ihre große Hilfsbereitschaft, die großartige Assistenz bei den  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenszintigraphien und den Therapien sowie der Unterstützung bei der Versorgung und Überwachung der Versuchstiere.

Frau Karin Bormann-Giglmaier danke ich ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Roswitha Beck danke ich für die Gespräche und vielen gute Ratschläge in wissenschaftlichen und persönlichen Anliegen.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Bartenstein möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich an einem gut ausgestatteten Arbeitsplatzes in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums Großhadern diese Dissertation durchführen durfte.

Meiner lieben Kollegin Sarah Pfeiffer danke ich ganz besonders dafür, mir den Umgang mit Zellkulturen beigebracht zu haben. Ihre hervorragenden Anleitungen haben es mir ermöglicht die Zellen für jeden Versuch selbständig und routiniert heran ziehen zu können. Außerdem danke ich ihr für die guten informativen und auch persönlichen Gespräche.

Johannes Zellmer danke ich sehr für die Einführung in die  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-Nierenzintigraphie und in den Umgang mit der Drei-Kopf-Gamma-Kamera. Seine geduldigen Erklärungen haben mir hierbei das eigenständige Arbeiten ermöglicht. Außerdem danke ich ihm, den Grundstock für die Auswertungen der Nierenzintigraphien gelegt zu haben.

Lena Vomacka und Astrid Gosewisch möchte ich für ihre Bereitschaft immer Rede und Antwort in physikalischen Fragestellungen gestanden zu haben und für die dosimetrischen Berechnungen Dank sagen. Lena gilt mein ganz besonderer Dank für das grandiose Auswertungsprogramm für die Nierenzintigraphien. Außerdem danke ich den beiden auch für die schöne gemeinsame Zeit in unserem kleinen Büro.

Herrn Dr. Franz Josef Gildehaus danke ich für die zuverlässigen Synthesen des  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und der  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Katja Steiger und Frau Dr. Friederike Lämmer des Instituts für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München bedanke ich mich für die histologische Auswertung der Nieren.

Frau Dr. Stieger, Frau Dr. Weber und Frau Dr. Sommerey der Laboklin GmbH und Co.KG, Bad Kissingen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Guido Böning und Dr. Andreas Delker danke ich sehr für die Hilfestellung in physikalischen Fragestellungen.

Bei Herrn Dr. Joachim von Pawel bedanke ich mich für die Vermittlung des Kontaktes zu Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde des Pharmazeutischen Instituts der Universität Bonn. Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde sowie Frau Mareike Mannewitz gilt mein großer Dank für die Zusammenstellung der äußerst hilfreichen Informationen zu diversen Zytostatika.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Zeidler sowie seiner Abteilung im Helmholtz Zentrum München danke ich für die Durchführung der FACS-Untersuchungen.

Den MTRAs der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums Großhadern danke ich für die Bereitstellung des  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>.

Für die sprachliche Nachbearbeitung des Summarys möchte ich mich bei Roberto Schmidl und Paul Cumming ganz herzlich bedanken.

Meiner lieben Kollegin und Freundin Eva Eilles danke ich von ganzem Herzen für ihre Freundschaft, ihre Unterstützung, die vielen, vielen Gespräche, die schöne gemeinsame Zeit und den Spaß, den wir zusammen hatten.

Meinem Vater möchte ich von Herzen danke sagen, dass er mir mein Studium ermöglicht hat.

Mama, dir danke ich von ganzem Herzen für deine Unterstützung in allem was ich mache, deinen Rückhalt, dein Verständnis und deine unendliche Geduld. Ohne dich hätte ich wäre ich nie so weit gekommen.

Herrn Dr. Günter Schumacher und Herrn Dr. Konstantin Zhernosekov der ITG Isotop Technologies Garching GmbH danke ich stets zuverlässige Kooperationspartner gewesen zu sein.

Der Bayerischen Forschungsförderung danke ich für die Finanzierung des Projektes.